

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. G. SCHMALZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DESINFEKTION ARTIFIZIELL INFIZIERTER
BOVINER WURZELKANÄLE
IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stephanie Hecker
aus Dorfen

2008

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. G. SCHMALZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DESINFEKTION ARTIFIZIELL INFIZIERTER
BOVINER WURZELKANÄLE
IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stephanie Hecker
aus Dorfen

2008

Dekan: Prof. Dr. B. Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schmalz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. T. E. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Literaturübersicht	7
2.1. Natriumhypochlorit	7
2.1.1 Wirkungsmechanismen des Natriumhypochlorits	7
2.1.2 <i>in vivo</i> Versuche zu Natriumhypochlorit	8
2.1.3 <i>in vitro</i> Versuche zu Natriumhypochlorit	9
2.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	13
2.2.1 Allgemeines zum Bakterium <i>Enterococcus faecalis</i>	13
2.2.2 <i>in vivo</i> Versuche zum <i>Enterococcus faecalis</i>	13
2.2.3 <i>in vitro</i> Versuche zum <i>Enterococcus faecalis</i>	15
2.3. Testmodelle	18
2.3.1 Testmodelle mit humanen Zähnen	18
2.3.2 Testmodelle mit bovinen Zähnen	20
2.4. Natriumthiosulfat	21
3. Fragestellung	23
4. Material und Methode	24
4.1. Eingesetzter Mikroorganismus	24
4.2. Testmaterialien	24
4.3. Nährmedien	24
4.4. Inkubation der <i>Enterococcus faecalis</i> Arbeitskultur	25
4.5. Sicherheitsvorkehrungen	25
4.6. Herstellung einer Gefrierkultur	25
4.7. Vorbereitung einer Arbeitskultur	27
4.8. Herstellung der Wurzelstücke	27
4.8.1 Gewinnung der Rinderzähne	27
4.8.2 Aufbereitung der Rinderzähne	27
4.9. Versuchsablauf	30
4.9.1 Versuchstag 1	30
4.9.2 Versuchstag 2	32
4.9.3 Versuchstag 3	33
4.9.4 Versuchstag 4	33

4.9.5 Versuchstag 5	33
4.9.6 Versuchstag 6	33
4.10. Versuchstag 7 (Versuchsende)	33
4.10.1 Desinfektion	34
4.10.2 Herstellung der Zahnstückhälften	35
4.10.3 Probengewinnung	37
4.10.4 Wachstumskulturen	38
4.10.5 Kolonien	39
4.11. Datenerhebung und statistische Analyse	39
4.11.1 Auszählen der koloniebildenden Einheiten	39
4.11.2 Statistische Auswertung	39
5. Ergebnisse	41
5.1. Absolute Kolonienzahlen	41
5.1.1 Sterilkontrollen	41
5.1.2 Infektionskontrollen	41
5.1.3 Desinfektionskontrollen	41
5.2. Relative Kolonienzahlen (aus absoluten Kolonienzahlen)	43
5.3. Relative Kolonienzahlen (\log_{10} -Stufen)	44
5.4. Einfluss der Natriumthiosulfatlösung auf die Bakterien	45
5.5. Rasterelektronenmikroskopische Bilder	45
6. Diskussion	49
6.1. Der Test und seine Durchführung	49
6.2. Antibakterielle Wirkung des Natriumhypochlorits und Verwendung des Natriumthiosulfates	50
6.3. Verteilung der Dentintubuli	51
6.4. Vergleich der hier entwickelten Methode mit der Methode nach HAAPASALO und ORSTAVIK (29)	53
7. Zusammenfassung	55
8. Anhang	57
8.1. Labormaterialien und Reagenzien	57
8.2. Signifikanztabellen	60
8.2.1 Signifikanzauswertung für die verschiedenen NaOCl-Konzentrationen	60
8.2.2 Signifikanzauswertung für den Desinfektionswirkungsstop	

JA/NEIN gegeneinander	61
8.2.3 Signifikanzauswertung für die Zeiten 30 Sekunden und 600 Sekunden gegeneinander	62
9. Literaturverzeichnis	63
10. Abkürzungsverzeichnis	72
11. Danksagungen	74
12. Lebenslauf	75

In Erinnerung an meine Oma,
Frau Eleonore Urban

1. Einleitung

Bakterien spielen in der Zahnmedizin eine wichtige Rolle. Sie sind verantwortlich für eine Vielzahl von Krankheitsbildern, nicht nur im Zahn-, sondern auch im Mund- und Kieferbereich. Dies zeigt sich jeden Tag in der Praxis durch die große Anzahl kariöser Läsionen, unterschiedlicher Parodontopathien oder bakterieller Weichgewebsinfektionen.

Seit die konservierende Zahnheilkunde versucht, kariös zerstörte Zähne durch Füllungstherapie zu erhalten, besteht das Problem des Kariesrezidivs. Dabei ist es sehr wichtig eine bakterienfreie Kavität zu schaffen, um eine dauerhafte, konservierende Versorgung zu gestalten und um damit der Problematik des Kariesrezidivs weitestgehend vorzubeugen.

Um die oben genannten Ziele zu verwirklichen, ist eine gründliche Exkavation der kariösen Zahnhartsubstanz besonders wichtig. Hierbei besteht allerdings die Gefahr, dass zuviel gesunde Zahnhartsubstanz geopfert wird und es zu einer Eröffnung der Pulpa kommt, was man vermeiden möchte. Der Wahlspruch „Soviel wie nötig und so wenig wie möglich“ ist in der Praxis also nicht immer leicht einzuhalten. Wurde die Pulpa erst einmal eröffnet, besteht stets die Gefahr einer Infektion der Pulpa und als Folge eine nicht mehr zu vermeidende endodontische Behandlung. Allerdings gibt es neuere Präparationsverfahren, die auf dem Einsatz von Laser- (11) oder Luftabrasionstechnologie (32) beruhen, welche die Möglichkeiten bieten sollen, selektiv erkranktes Dentin zu entfernen und der Pulpa damit einen höheren Schutz gewährleisten.

Unabhängig davon, für welche Methode man sich entscheidet, um die Kavität vorzubereiten, wird von den Lehrbüchern der Zahnerhaltung (76) einheitlich empfohlen, dass vor dem Legen der Füllung eine gründliche Desinfektion der Kavität mit einem der klassischen Desinfektionsmittel zu erfolgen hat. Als die am gängigsten und häufigsten verwendeten Agenzien sind hier Chlorhexidin (CHX) und Natriumhypochlorit (NaOCl) zu nennen. Mit diesen Substanzen wird die Keimzahl bereits von Anfang an auf ein Minimalmaß reduziert.

Sollte es trotz aller Vorsichtsmaßnahmen zu einer Karies unter der Füllung kommen, die bis zur Pulpa reicht, bzw. erscheint der Patient erst, wenn sich eine Wurzelkanalbehandlung nicht mehr vermeiden lässt, so sind auch hier wieder CHX und NaOCl die Mittel der Wahl für die Desinfektion der Wurzelkanäle. Denn vor allem bei Wurzelkanalinfektionen ist es sehr wichtig, sämtliche Mikroorganismen aus dem Wurzelkanal zu beseitigen (25).

Ein häufig in der Endodontie vorkommender Keim ist der *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). In dieser Arbeit wurde eine in vitro Methode entwickelt die eine Testung von Desinfektionslösungen (hier NaOCl) in artifiziell infizierten Rinderzahnwurzeln (hier mit *E. faecalis*) ermöglicht. Die Desinfektionswirkung wurde bei der Hälfte der Proben mittels Natriumthiosulfat abgestoppt, so dass man genaue Desinfektionszeiten einhalten konnte. Bei der anderen Hälfte der Proben konnte das Desinfektionsagens in den Dentinkanälchen noch nachwirken. In den Ergebnissen sah man den Unterschied zwischen genauen Desinfektionszeiten und der Desinfektion mit Nachwirkung.

2. Literaturübersicht

2.1. Natriumhypochlorit (NaOCl)

2.1.1 Wirkungsmechanismen des Natriumhypochlorits

Wird NaOCl, eine stark basische Substanz ($\text{pH} > 11$) (16), in Wasser gelöst, so stellt sich ein chemisches Gleichgewicht zwischen NaOCl und Wasser einerseits und zwischen Natriumhydroxid (NaOH) und unterchloriger Säure andererseits ein.

Die unterchlorige Säure und das NaOH können wieder in einer Gleichgewichtsreaktion in die Ionen Na^+ , OH^- , H^+ und OCl^- zerfallen (Abb. 1):



Abbildung 1: Chemische Gleichgewichtsreaktion beim Lösen von Natriumhypochlorit in Wasser (16)

Ausgehend von diesen Reagenzien sind diverse Reaktionen möglich, über die organisches Material, Enzyme und Stoffwechselvorgänge beeinflusst werden können. NaOH kann im Sinne einer Verseifungsreaktion (Abb.2) mit Fettsäureestern, unter Abspaltung von Alkoholen, Seife bilden. Salze von Fettsäuren werden als Seifen bezeichnet.

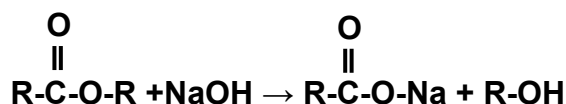


Abbildung 2: Verseifungsreaktion von Fettsäuren mit Natriumhydroxid (16)

Angriffspunkte dieser Reaktion können zum Beispiel die Phospholipide der Zellmembranen sein, die Fettsäuren darstellen (16;18). Weiterhin setzen die gebildeten Seifen durch ihre Tensidwirkung die Oberflächenspannung in der Lösung stark herab (16).

Ein zweiter Reaktionsweg ist die Neutralisation von säureresttragenden Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure) durch NaOH unter Bildung von Salzen und Wasser (Abb. 3). Die Veränderung der Aminosäureseitenketten bedeutet für ein Protein die Veränderung der Primärstruktur und bedingt dadurch folglich auch eine Beeinflussung der Tertiärstruktur, welche für die Funktion des Proteins verantwortlich ist (46).

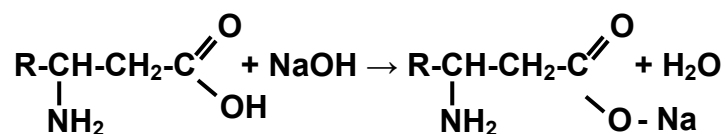


Abbildung 3: Neutralisation einer Aminosäure mit Natriumhydroxid unter Bildung von Salz (16)

Der dritte Reaktionsweg greift ebenfalls in die Enzymfunktion der Zellen ein. Die bei der Lösung von NaOCl in Wasser entstehende Säure, ist in der Lage, mit Aminosäuren aus Proteinen, im Sinne einer Transaminierungsreaktion Chloramine zu bilden (Abb.4), was zu einer Hydrolyse der Proteinketten führt (16). Unterchlorige Säure ist darüber hinaus in der Lage, die –SH Gruppen von Cystein zu oxidieren, was ebenfalls in einer irreversiblen Hemmung der Enzymaktivität resultiert. Letztendlich greift NaOCl durch seinen hohen pH-Wert, über die Veränderung des Zellstoffwechsels, die Degeneration der Zellmembran und die irreversible Enzymhemmung schädigend in den zellulären Metabolismus ein (7;18).

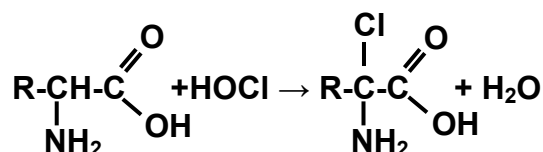


Abbildung 4: Bildung eines Chloramins aus unterchloriger Säure und einer Aminosäure (16)

NaOCl ist wegen der oben genannten Eigenschaften in der Lage, zelluläres Gewebe aufzulösen (5;34;43;101;108). Die Geschwindigkeit der Gewebsauflösung ist direkt proportional zur Konzentration der wirksamen NaOCl-Lösung und wird durch die Anwesenheit von oberflächenaktiven Substanzen herabgesetzt (95). Anorganische Substanzen wie Hydroxylapatit bleiben unverändert (13).

2.1.2 in vivo Versuche zu Natriumhypochlorit

Wird NaOCl als Kavitätendesinfektionsmittel vor dem Legen von Füllungen in vitale Zähne verwendet, so ergab ein Tierversuch von TANG et al. (99), dass bei 5 Minuten (min) Einwirkzeit von 5,25% NaOCl kein Schaden an der vitalen Pulpa entsteht, der das Präparationstrauma übertrifft. Die Restdentindicke zwischen den Füllungen und der Pulpa betrug in jedem Fall zwischen 0,5 und 1,5 Millimeter (mm).

Eine Untersuchung von ZAMANY et al. (109) bezüglich der Wurzelkanal desinfektion ergab, dass in Wurzelkanälen, die zuvor mit 1% NaOCl behandelt wurden, die

Menge an verbliebenen Bakterien durch eine nachfolgende Spülung mit 2% CHX nochmals signifikant gesenkt werden konnte. Bei dieser Studie wurde eine röntgenologische, apikale Aufhellung bei einem einwurzeligen Zahn mit einer nekrotischen Pulpa vorausgesetzt, um an der Untersuchung teilzunehmen.

In einer Studie von SCHIRRMESTER et al. (75) wurden wurzelkanalbehandelte Zähne untersucht, die alle symptomfrei waren, aber trotzdem eine apikale Aufhellung aufwiesen. Infolgedessen wurde eine Revision der Wurzelfüllung vorgenommen. Während dieser wurde, nach jedem Zwischenschritt, eine Probe auf Bakterien mittels Papierspitzen aus dem Zahn entnommen. Als Spüllösung wurde NaOCl (2,5%), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (17%), sterile Natriumchloridlösung und CHX (2%) verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass bereits nach der Behandlung mit NaOCl und EDTA, in den anfangs infizierten Zähnen, keine Bakterien mehr enthalten waren. Über eine Verbesserung der Desinfektion durch die anschließende Verwendung von CHX kann somit keine Aussage getroffen werden. Die Wirkung des NaOCl wurde in dieser Studie mit Natriumthiosulfat abgestoppt. Über Einwirkzeiten wurde nichts berichtet.

Dass auch nach einer Behandlung mit NaOCl noch Bakterien im Kanal verbleiben können, zeigt eine Untersuchung von NAIR et al. (57). Sie untersuchten 16 endodontisch behandelte Zähne. In 14 dieser Zähne wurde nach Aufbereitung, der desinfizierenden Spülung und der Füllung noch eine bakterielle Infektion gefunden. Die Bakterien waren in unzugänglichen Nischen und in akzessorischen Kanälen.

2.1.3 in vitro Versuche zu Natriumhypochlorit

TONAMI et al. (100) stellten in einer vergleichenden Studie zwischen Chloraminen (Reaktionsprodukte von NaOCl mit Aminosäuren), die im Carisolv-System verwendet werden und unverändertem NaOCl fest, dass die Reaktion mit Aminosäuren zum einen die Aggressivität von NaOCl gegen gesundes Dentin verringert, zum anderen aber den auflösenden Effekt gegen degeneriertes Kollagen in kariösem Dentin verstärkt. Im Verlauf der Gewebsauflösung durch NaOCl verändert sich die Oberflächenspannung im Gewebe (95). Waren zuvor im Gewebe keine oberflächenaktiven Substanzen vorhanden, so fällt die Oberflächenspannung im Zuge der Gewebsauflösung stark ab (95). Waren allerdings bereits vor Beginn der Gewebsauflösung Tenside im Gewebe vorhanden, so steigt die Oberflächenspannung während der Gewebsauflösung leicht an (16;95). Die Geschwindigkeit, der durch NaOCl bewirkten

Gewebsauflösung, ist abhängig von der vorherrschenden Temperatur. Je höher die Temperatur der NaOCl-Lösung, umso schneller löst sich das Pulpengewebe bei Rinderzähnen auf (16). Je höher die initiale Konzentration von NaOCl gewählt wird, umso weniger sinkt, während der Gewebsauflösung, der pH-Wert ab (95). In der Zahnheilkunde werden verschiedene Konzentrationen von NaOCl als antibakterielle Lösung eingesetzt, z.B. 0,5%, 1%, 2,5% oder 5,25%. Wobei die erforderliche Mindesteinwirkzeit, die zu einer vollständigen Abtötung aller vorhandenen Bakterien führt, je nach Bakterium und Konzentration variiert. So sind nach einer Studie von RADCLIFF et al. (65), bei einer 0,5%igen NaOCl-Lösung 10 Sekunden (sec) direkter Kontakt ausreichend, um sämtliche in der Testlösung befindliche *Actinomyces naeslundii* bzw. *Candida albicans* Individuen unschädlich zu machen. Bei *E. faecalis* benötigt eine 0,5%ige NaOCl Desinfektion dagegen 30min, um den selben Effekt zu erzielen. Um eine vollständige Abtötung aller in einer Lösung befindlichen *E. faecalis* Bakterien innerhalb von 2min zu erreichen, ist eine NaOCl-Konzentration von 5,25% erforderlich. Von diesen Bakterien geht deshalb auch die Gefahr einer Reinfektion des aufbereiteten Wurzelkanals bei unsorgfältiger Spülung aus. VIANNA et al. (103) bestätigen diese Ergebnisse.

Allerdings modifiziert NaOCl die Hybridschicht derart, dass die Haftfestigkeiten von Bondingsystemen, in Abhängigkeit von der Einwirkzeit, signifikant absinken (63). Die Absolutwerte variierten in dieser Studie je nach Bondingsystem. Bei Prime and Bond NT (Dentsply Caulk, Milford, DE, USA) reduzierte NaOCl nach 60sec Einwirkzeit die Haftfestigkeit auf 31%, bei Single Bond (3M Dental Products Division, St. Paul, MN, USA) auf 38%. 100% entsprachen hier einer Einwirkzeit von 0sec.

Im niedrigen Konzentrationsbereich von NaOCl zeigt sich nach HIDALGO und DOMINGUEZ (37) ein förderlicher Einfluss auf das Zellwachstum: Während Konzentrationen von mehr als 0,01% NaOCl die erwähnten inhibitorischen Effekte zeigten, wurde durch die Einwirkung von weniger als 0,005% NaOCl eine gesteigerte Zellteilungsrate bei Fibroblasten beobachtet. Untersuchungen durch CHANG et al. (7) über die Wechselwirkungen von NaOCl und CHX, mit Zellen des menschlichen Parodonts, zeigten für beide Stoffe eine ausgeprägte zeit- und konzentrationsabhängige Zytotoxizität und eine Hemmwirkung auf die Mitochondrienaktivität. CHX hemmte, im Gegensatz zu NaOCl, darüber hinaus die Proteinsynthese in den untersuchten Zellen.

In einer Studie von BERBER et al. (4) zeigt sich, dass NaOCl vor allem in höheren Konzentrationen (5,25%) Dentinkanälchen desinfizieren kann, unabhängig von der verwendeten Wurzelkanalaufbereitungsmethode. Auch in der Studie von GIARDINO et al. (23) erwies sich 5,25%iges NaOCl als am effektivsten, im Vergleich zu BioPure MTAD und Tetraclean, gegen *E. faecalis*. BioPure MTAD (Dentsply Tulsa Dental Johnson City, TN, USA) und Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Milano, Italien) sind Wurzelkanaldesinfektionsmittel, bestehend aus einem Tensid, einer Säure und dem Breitbandantibiotikum Doxycyclin. Das Antibiotikum ist bei Tetraclean jedoch in geringerer Konzentration, als bei BioPure MTAD, enthalten. Die Abkürzung MTAD steht für die Initialen des Entwicklers MT, das T deutet darüber hinaus auf das enthaltene Tetracyclin hin, A für die Säure (acid) und D für das Detergens. Die oben genannten Ergebnisse, von GIARDINO et al. (20), decken sich mit den Resultaten, die DUNAVANT et al. (14) in ihren Versuchen erhielten.

Für die Qualität der Abdichtung mit Wurzelkanalfüllmaterial im apikalen Bereich spielt es laut MARLEY et al. (50) keine Rolle, ob zuvor 5,25% NaOCl oder 0,12% CHX als Spüllösung verwendet wurde. WUERCH et al. (107) bestätigen die weitgehende Unabhängigkeit der apikalen Abdichtung von der verwendeten Desinfektionsmethode.

Problematisch zeigt sich jedoch der direkte Vergleich des antibakteriellen Effekts von NaOCl und CHX in *in vitro* Experimenten. ESTRELA et al. (19) führten eine Studie über den antimikrobiellen Effekt von 2% NaOCl und 2% CHX durch, die die Wirkung der beiden Substanzen einerseits im Agardiffusionstest und andererseits durch direkte Exposition (mittels Papierspitzen) verglich. Bei der direkten Exposition wurden Papierspitzen in die verschiedenen Bakteriensuspensionen eingetaucht, im Anschluss desinfiziert und in einem Medium für 48h inkubiert. Das bakterielle Wachstum wurde durch die Trübung des Mediums bestimmt. Die Studie zeigte, dass bei Agardiffusionstests CHX wirksamer gegen *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* und *C. albicans* war, als NaOCl. Bei der direkten Exposition hemmte NaOCl dagegen sämtliche getesteten Bakterien vollständig im Wachstum, während CHX bei *P. aeruginosa* und *B. subtilis* ein Wachstum zuließ. Allerdings zeigten SASSONE et al. (72) in einem Versuch, mit verschiedenen Konzentrationen von CHX (0,12%, 0,5%, 1%) und NaOCl (1%, 5%) gegen *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, *F. nucleatum* und *P. gingivalis*, dass die beiden Wirkstoffe in allen Konzentrationen gegen alle getesteten Mikroorganismen, außer *E. faecalis*, sofort bakterizid wirken. Nur bei letzte-

rem wird eine CHX-Konzentration von 1% benötigt, um ihn unverzüglich zu eliminieren. 0,5% CHX benötigt dafür eine Einwirkzeit von 5min. 0,12% CHX zeigt bei beliebig langer Einwirkzeit keine Wirkung gegen *E. faecalis*.

WEBER et al. (105) untersuchten die Langzeitwirkung von NaOCl und CHX und fanden heraus, dass CHX in einem Wurzelkanal auch nach 7 Tagen noch antibakteriell wirkt, während bei NaOCl bereits nach 48 Stunden (h) keine Wirkung mehr nachgewiesen werden konnte. Weiterhin sei die Dauer der antibakteriellen Wirkung, durch 1min Ultraschalleinwirkung, verlängerbar. Hier zeigte sich bei NaOCl auch nach 48h noch eine antibakterielle Aktivität. ROSENTHAL et al. (69) konnten sogar nach 12 Wochen in einer *in vitro* Studie an Rinderzähnen noch Residualaktivität von CHX messen. Bezüglich der Haftfestigkeit von Bondingsystemen, nach Spülung von Wurzelkanälen, berichten MORRIS et al. (54), dass eine 15- bis 20-minütige Spülung mit 5% NaOCl die Verbundfestigkeit mit dem Wurzelfüllmaterial, im Vergleich zu einer Spülung mit 0,9% NaOCl, von 23,6MPa auf 7,7MPa senken kann. Der Effekt ist aber durch eine Folgespülung mit 10% Ascorbinsäure vermeidbar. Diese Folgespülung erhöht die Verbundfestigkeit sogar über den Vergleichswert auf 27,7MPa. Außerdem senkt NaOCl nach WHITE et al. (106) bei einer Einwirkzeit von 5 Wochen die Bruchfestigkeit, der nach endodontischer Behandlung verbliebenen Wurzelzahnsubstanz, signifikant. SIM et al. (85) und GRIGORATOS et al. (28) bestätigen diesen schwächenden Effekt, besonders bei hohen (3-5%) NaOCl-Konzentrationen. Hohe Konzentrationen von NaOCl sind laut SIQUEIRA et al. (89) jedoch gar nicht notwendig. Bei regelmäßigem Wechsel der Spülflüssigkeit ist 1% NaOCl für eine erfolgreiche Wurzelkanalbehandlung vollkommen ausreichend. In diesem Versuch wurden keine Aussagen bezüglich verschiedener Einwirkzeiten für die Desinfektion getroffen.

NaOCl ist also effektiv gegen Bakterien und Pilze. In hohen Konzentrationen (5%) kann es sogar bakterielle Sporen abtöten, wie unterschiedliche Versuche zeigten (2;9;38). ESTRELA et al. (16) haben zusammengefasst, warum NaOCl das am häufigsten verwendete Desinfektionsmittel ist: Seine Wirkungsmechanismen bedingen Veränderungen im zellulären Metabolismus und die Zerstörung von Phospholipiden. NaOCl bewirkt die Bildung von Chloraminen, die in den zellulären Metabolismus eingreifen, oxidative Vorgänge mit irreversibler, enzymatischer Inaktivierung in Bakterien und den Abbau von Lipid- und Fettsäuren.

2.2. Enterococcus faecalis

2.2.1 Allgemeines zum Bakterium *Enterococcus faecalis*

Der Name „*enterocoque*“ wurde als erstes von THIERCELIN in seinem Artikel „Sur un diplocoque saprophyte de l'intestine susceptible de devenir pathogene.“, der 1899 veröffentlicht wurde, verwendet, um einen grampositiven *Diplococcus* von intestinalem Ursprung, der Paare und kurze Ketten bildet, zu beschreiben (55). 1906 wurde der Begriff *Streptococcus faecalis* durch ANDREWS und HORDER geprägt und erst etliche Jahre und Forschungsergebnisse später, entstand die Bezeichnung *E. faecalis* (56). Die am meisten auftretenden Stämme der *Enterococce*, sind der *E. faecalis* und der *E. faecium* (56;58).

Der *E. faecalis* ist ein grampositiver, fakultativ anaerober Mikroorganismus, der gegen viele antibakterielle Lösungen resistent ist (12;86;88). Er wurde u.a. in infizierten Wurzelkanälen (97), akuten apicalen Abszessen (44) und in wurzelkanalgefüllten Zähnen (26;62), mit persistierenden Infektionen (22;33;68;91;97) gefunden. Er ist ein wichtiger Faktor bei fehlgeschlagenen endodontischen Behandlungen (45). Der *E. faecalis* ist außerdem in Plaque, Speichel, auf der Mundschleimhaut und Gingiva (30;51;66;92) zu finden. Auch in abgefüllten Wurzelkanälen wird der *E. faecalis* sehr oft gefunden (12;97).

Doch der *E. faecalis* macht nicht nur Probleme in der Mundhöhle. Er ist auch für viele andere Erkrankungen verantwortlich, wie z.B. für Endocarditis, Neonatale Infektionen u. a.. 1984 führte die National Nosocomial Infection Surveillance Summary die Gattung des *Enterococcus* sogar als den am dritt häufigsten verantwortlichen Keim für nosokomiale Infektionen auf (56).

2.2.2 in vivo Versuche zum *Enterococcus faecalis*

MOLANDER et al. (53) fanden in ihren Tests mit wurzelkanalgefüllten Zähnen, die eine röntgenologische Aufhellung zeigten, am häufigsten Bakterien, die zur Gattung des *Enterococcus* gezählt werden. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von ERCAN et al. (15), bei denen alle untersuchten Zähne den *E. faecalis* aufwiesen. Bei den hier untersuchten Zähnen handelte es sich um Zähne mit einer nekrotischen Pulpa und einer periapikalen Aufhellung.

VERGIS et al. (102) machten eine prospektive Studie bei Patienten, mit einer Bakteriämie von Enterokokken. Nach der Blutabnahme am Patienten wurde dieses

auf die unterschiedlichen Enterokokkenarten hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass von den 398 gefundenen Enterokokkenarten 60% *E. faecalis* und 37% *E. faecium* waren. 35% der 398 Arten waren resistent gegenüber Vancomycin (Aminoglykosid-Antibiotikum), 63% waren gegen das Medikament empfindlich und bei 2% zeigte sich eine eingeschränkte Wirkung. 8% der *E. faecalis* waren ebenfalls resistent gegen Vancomycin. Getestet wurde hier außerdem die Wirkung von Ampicillin (β -Lactam-Antibiotikum) und Gentamicin (Aminoglykosid-Antibiotikum). Eine Resistenz gegen Ampicillin lag bei 3% der *E. faecalis* vor und 37% der *E. faecalis* zeigten eine Resistenz gegenüber hochdosiertem Gentamicin. Inwieweit eine Resistenz gegen Quinupristin-Dalfopristin gegeben ist, wurde nur für *E. faecium* getestet, weil *E. faecalis* fast immer eine Resistenz aufweist. Bei einer Untersuchung mit Clindamycin zeigte sich, dass auch dieses Medikament keinen besonderen Einfluss auf das Bakterium hat (52).

In einer *in vivo* Untersuchung von SUNDQVIST et al. (97) wurden Wurzelkanalrevisionen durchgeführt. Von 24 der 54 untersuchten Wurzelkanäle wurden, nach der Entfernung der Wurzelkanalfüllung, die einzelnen Bakterienarten durch eine Probenentnahme aus dem Kanal mittels Papierspitzen bestimmt und es zeigte sich, dass *E. faecalis* mit seinen insgesamt 9 infizierten Wurzelkanälen der Keim war, der am häufigsten diagnostiziert wurde. In allen diesen neun Fällen war er außerdem der einzige Keim, der in den Kanälen gefunden wurde. Die Erfolgsrate der Zähne, bei denen nach der Entfernung der ursprünglichen Wurzelfüllung *E. faecalis* gefunden wurde, lag mit 66% unter dem Durchschnitt der Ausheilungsrate. Bei den Zähnen bei denen man keine Bakterien nach der Revision fand, lag der Heilerfolg bei 73%. Der Unterschied der beiden Gruppen war damit statistisch nicht signifikant. Bei Proben aus dem Wurzelkanal, die man vor der neuen Wurzelfüllung nahm, wiesen noch sechs Zähne Mikroorganismen auf. Vier dieser Zähne heilten auch nach der endodontischen Revision innerhalb der untersuchten 5 Jahre nicht aus. Drei davon waren mit *E. faecalis* infiziert.

Welche Mikroorganismen man *in vivo* in wurzelkanalbehandelten Zähnen findet, die eine periapikale Entzündung aufweisen, wurde in einer Studie von PINHEIRO et al. (64) gezeigt. Hierfür wurden 60 Zähne untersucht, die einen radiologischen Verdacht auf eine periapikale Entzündung zeigten. Nachdem man alle Restaurationen, Stifte, eventuell vorhandene Karies und die Wurzelkanalfüllung entfernt hatte, wurde ein Kofferdamm angelegt und die Kavität mit 5,25% NaOCl desinfiziert. Die Wirkung die-

ses Agens wurde mit einer 5%igen Natriumthiosulphatlösung abgestoppt, um keine Einflüsse auf die spätere Bakteriengewinnung zu bekommen. Der zu untersuchende Wurzelkanal war immer der, der die periapikale Aufhellung am Röntgenbild zeigte. War dies bei mehreren Wurzelkanälen der Fall, nahm man den größten Kanal. Im Anschluss wurde die Wurzelkanalfüllung mit Gates-Bohrern und endodontischen Feilen entfernt. Auf chemische Lösungen wurde dabei vollständig verzichtet, das einzige was verwendet wurde, war sterile, physiologische Kochsalzlösung. Die Proben-gewinnung wurde mittels Papierstäbchen durchgeführt, die auf volle Länge in den Kanal eingebracht wurden und dort für 60sec verblieben. Man verwendete so viele Papierstäbchen wie nötig waren, um den Kanal zu trocknen. Anschließend wurden alle Papierstäbchen sofort in ein Transport-Medium gegeben. Nach einigen Arbeits-schritten im Labor zeigte sich nach der Aufteilung und der Differenzierung der ge-wonnenen Bakterien, dass der mit Abstand am häufigsten gefundene Keim der *E. faecalis* war. Dieses Bakterium wurde in 27 der 60 untersuchten Zähne gefunden (45%). Am zweit häufigsten fand man den *P. prevotii*, allerdings nur in 6 der unter-suchten Zähne, gefolgt von den *S. constellatus* und den *P. micros* bei jeweils 5 Zäh-nen.

Der *E. faecalis* kann in Wurzelkanäle eindringen, die antibakteriellen Maßnahmen überleben und infolge dessen dort nach der Wurzelkanalfüllung verbleiben (97). Eine höhere Konzentration an *E. faecalis* wird außerdem in Zähnen gefunden, die über den Zeitraum der Behandlung hinweg keinen dichten Verschluss haben, bzw. in sol-chen, bei denen die Behandlung mindestens zehn Sitzungen in Anspruch nahm (90). Wenn *E. faecalis* von Anfang an, in geringer Anzahl vorhanden ist, kann er nor-malerweise beseitigt werden. Hat er sich allerdings im Kanal ausgebreitet, so ist der *E. faecalis* ein sehr schwer auszurottender Organismus (97).

In Tierstudien, bei denen unvermischte Bakterienkulturen verwendet wurden, um einzeln mit ihnen Wurzelkanäle zu infizieren, wurde festgestellt, dass der *E. faecalis*, anders als andere Bakterien, die Wurzelkanäle in den meisten Fällen besiedelt und dort ohne die Unterstützung von anderen Bakterien überleben kann (21;93).

2.2.3 in vitro Versuche zum *Enterococcus faecalis*

Schon lange weiß man von der Resistenz des *Enterococcus faecalis* gegen endo-dontische Behandlungen. Tatsächlich ist sogar Calciumhydroxid als unwirksam ge-gen *E. faecalis* eingestuft worden (29;34;49;67). Diese Unwirksamkeit des Calcium-

hydroxids basiert wahrscheinlich zum Teil auf der Effektivität eines Protonenpumpenmechanismus, welcher optimale zytoplasmatische pH-Levels aufrecht erhält (20).

Der *E. faecalis* ist darüber hinaus in der Lage, in Dentinkanälchen einzudringen (47;88;96;104). Wie weit Bakterien und Pilze in die Dentinkanäle eindringen, zeigten Sen et al. (79) in ihrer Studie. Das Ergebnis war, dass Kokken und Stäbchen bis zu einer Tiefe von 150µm in den Dentinkanälen gefunden werden konnten. Durch das Eindringen des *E. faecalis* in die Dentintubuli überlebt er die chemomechanische Aufbereitung und die Medikation, weshalb er dann die Dentinkanälchen des endodontisch versorgten Zahnes wieder infizieren kann (29;61). SHIH et al. (83) sind nach Abschluss ihrer Versuche der Ansicht, dass eine NaOCl-Konzentration von 5,25% notwendig ist, um die bakterielle Besiedlung eines infizierten Wurzelkanals effektiv zu reduzieren. Eine Studie von ROSSI-FEDELE und ROBERTS (70) zeigte außerdem, dass es *E. faecalis* Stämme gibt, deren Wachstum durch den Einfluss von Tetrazyclin gehindert wird. In einem Versuch von SEDGLEY et al. (78) zeigte sich, dass alle untersuchten Stämme empfindlich gegen Ampicillin waren und nur ein Stamm eine Resistenz gegenüber Gentamicin zeigte.

SILVA et al. (84) zeigten in ihrem *in vitro* Versuch, dass die höchste Reduktion des *E. faecalis* (99,2%) mit der photodynamischen Therapie (PDT) erreicht wurde. Die Verwendung von 0,5%igem NaOCl für 30min brachte in diesem Fall eine Verminderung von 93,25%. Es gibt jedoch auch Studien, die besagen, dass bei *in vitro* Versuchen die koloniebildenden Einheiten bei einer Behandlung mit 0,5% NaOCl für 30min auf Null reduziert werden (24;65).

Bei einer Testreihe die von ABDULLAH et al. (1) durchgeführt wurde, wurden verschiedene Desinfektionsmittel mit verschiedenen Wirkzeiten, im Hinblick auf ihre Wirkung gegen den *E. faecalis*, getestet. Die hier untersuchten Bakterienkulturen waren klinische Isolate, die als Biofilm oder planktonische Suspension gewachsen waren. NaOCl stellte das effektivste Mittel der hier untersuchten Agenzien (Calciumhydroxid; 0,2% Chlorhexidinglukonat; 17% EDTA; 10% PVP-Iod (Povidon-Jod) und 3% NaOCl) dar, da hier bereits nach 2min keine Bakterien mehr vorhanden waren. In einer Versuchsreihe von SENA et al. (80) war der *E. faecalis* bei einer Behandlung mit 2,5% NaOCl schon nach 30sec vollständig eliminiert.

Die Fähigkeit des *E. faecalis*, ungünstige Bedingungen zu tolerieren und sich ihnen anzupassen, ist ein Vorteil gegenüber anderen Arten. Dies könnte auch die Erklär-

rung für das Überleben des *E. faecalis* bei Wurzelkanalinfektionen sein, trotz der knappen Nährstoffe und den wenigen Möglichkeiten, den Wurzelkanalmedikamenten zu entkommen (39;96). In einem Versuch von HELING et al. (36) wurde die minimale, wachstumshemmende Konzentration (MIC) und die minimale, bakterizide Konzentration (MBC) für NaOCl im Hinblick auf den *E. faecalis* getestet. Hierbei lag die MIC bei 0,157% und die MBC bei 2,5%.

Studien von SHABAHANG et al. (81) sowie NEWBERRY et al. (60) lieferten bereits Ergebnisse zu NaOCl und MTAD. Hier wurden die beiden Desinfektionsmittel jedoch einzeln getestet und es zeigte sich, dass NaOCl wirksamer war als MTAD. KRAUSE et al. (42) zeigten ebenso in Ihrem Versuch, dass NaOCl das Wirksamste war.

In einer Studie von SHABAHANG et al. (82) wurde an extrahierten, menschlichen Zähnen der Effekt von MTAD alleine und in Verbindung mit NaOCl getestet. Als Zähne verwendete man 85 menschliche Oberkieferfrontzähne. Die Versuchszähne wurden als erstes für vier Wochen mit dem *E. faecalis* infiziert. Vor Testung der einzelnen Probesubstanzen wurden in diesem Versuch die Wurzelkanäle auf ISO-Größe 35 aufbereitet. In dieser Studie gab es 5 Untersuchungsgruppen. Bei allen 5 Gruppen erfolgte während der Aufbereitung, nach jeder Instrumentengröße eine Spülung mit einem Milliliter der zu untersuchenden Substanz, so dass insgesamt 5 bis 6ml Spüllösung pro Zahn verwendet wurden. Bei der Gruppe A verwendete man 1,3% NaOCl als Spüllösung für die Aufbereitung und im Anschluss wurde der Zahn für 5min in MTAD gelegt. Anders bei Gruppe B, nach der NaOCl Spülung wurde der Zahn für 5min in 1,3%iges NaOCl gelegt. Bei der Gruppe D hingegen, wurde der Zahn nach der Spülung für 1min in EDTA gelegt und im Anschluss für 5min in 1,3% NaOCl. Für die Gruppen C und E erfolgte die Spülung mit 5,25% NaOCl. Bei C wurde der Zahn im Anschluss für 5min in 5,25% NaOCl gelegt, für die Gruppe E erfolgte nach der Spülung das Legen in EDTA für 1min und in 5,25% NaOCl für 5min. Das Ergebnis dieser Studie, die mit 1,3% NaOCl und 5,25% NaOCl arbeitete, war, dass Gruppe A die beste Desinfektion zeigte, bestehend aus einer Kombination von 1,3% NaOCl und MTAD. Dies war die einzige Kombination in diesem Versuch, bei dem kein Zahn, bei der späteren Überprüfung, mehr eine Besiedlung mit *E. faecalis* zeigte.

In einem Versuch, in dem ausschließlich *E. faecalis* verwendet wurde, untersuchte man den Einfluss unterschiedlicher Sealer auf das Überleben der Bakterien (71). Die

Ergebnisse waren sehr unterschiedlich und es zeigte sich, dass bei einem Sealer, dessen Zusammensetzung auf Zinkoxid-Eugenol basiert und bei einem Sealer auf Harzbasis, kein Bakterienwachstum mehr gefunden werden konnte. Bei Wurzelkanalfüllungen, die einen dieser Sealer verwendeten, sah man, dass alle Bakterien in einem Umkreis von 300µm um den Wurzelkanal herum abgetötet wurden. Bei allen anderen konnte man ein, zum Teil auch starkes *E. faecalis* Wachstum feststellen.

2.3. Testmodelle

2.3.1 Testmodelle mit humanen Zähnen

In einer Versuchsreihe von LOVE et al (48) wurden frisch extrahierte, humane einwurzelige Zähne verwendet. Nach dem Abtrennen der klinischen Krone wurden die Wurzelkanäle mittels Step-back Technik aufbereitet und mit 17% EDTA und 5,25% NaOCl gespült. 1mm vor dem Apex wurde ein apikaler Stop geschaffen. Vor der Verwendung im Versuch wurden diese Zähne für eine Woche in sterilem Wasser aufbewahrt. Um die Sterilität zu gewährleisten wurde eine Zahnprobe für diese Woche in Medium aufbewahrt. Von diesem Medium wurde täglich eine Kontrolle entnommen und auf Agar-Platten gegeben, die bei 37°C über Nacht inkubiert wurden. Das hier verwendete Bakterium war der *Streptococcus gordonii*. Dieser wurde als Flüssigkultur in ein Fläschchen gefüllt, in das die Zahnproben hinzugegeben und für 21 Tage bei 37°C inkubiert wurden. Alle drei Tage wurde das enthaltene Medium durch neues ersetzt. Von dem gebrauchten Medium wurden 1,0ml Stichproben entnommen, die erneut auf Agar-Platten ausgebracht wurden. Hiermit wollte man die Reinheit und die Vitalität der Bakterien kontrollieren. Nach der Inkubationszeit wurden die 10 Zahnproben und die Kontrollprobe in 10% gepuffertes Formalin gegeben, in Methansäure und Formalin demineralisiert, in Lithiumkarbonat neutralisiert, in Wasser gewaschen und getrocknet. Die Zahnproben wurden bei der Hälfte der Wurzellänge geteilt und in Wachs gefasst. Im Anschluß wurden sie in unterschiedlich große Stücke geschnitten. Die Schnittstücke wurden mit einer Brown and Bann Färbung eingefärbt und die infizierten Kanäle gezählt. Die Tiefe der Besiedelung wurde ebenfalls festgehalten. Die maximale Eindringtiefe lag hier bei 200µm. Die Infektion war von Kanal zu Kanal verschieden.

Ein anderes Testmodell mit humanen Zähnen wurde von SCHÄFER et al (73) verwendet. Es wurden nur einwurzelige Zähne einbezogen. Auch hier wurde die

klinische Krone entfernt und ein gerader Zugang zum Kanal geschaffen. Die Wurzelkanäle wurden bis 1mm vor dem Apex, bis Größe 40, aufbereitet. Um die Schmier-
schicht zu entfernen wurde 10%ige Zitronensäure verwendet. Die Zähne wurden getrocknet und gewogen. Anschließend wurden die Kanäle mit Wasser gefüllt und die Zähne erneut gewogen, um das mögliche Volumen abzuschätzen. Die so vorbehandelten Zähne wurden in 70%igem Alkohol aufbewahrt. Vor ihrer Verwendung wurden sie für 24h in steriles Wasser gegeben und anschließend getrocknet. Dann wurden die Zähne im Medium in einer Flasche zweimal für 30min bei 120°C autoklaviert. Während der zwei Zyklen wurden Proben aus den Flaschen entnommen, um Sterilität zu gewährleisten. Nach dem ersten Autoklaviervorgang wurden die Zähne in ein Ultraschallbad zu frischem Medium gegeben, um das Eindringen des Mediums in die Dentinkanälchen zu beschleunigen. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium entfernt und die Zähne getrocknet. Als Bakterium wurde in diesem Versuch der *E. faecalis* verwendet und in die Kanäle injiziert. Die Zähne wurden auf eine Agar-Platte gestellt und diese mit 200µl Natriumchloridlösung bedeckt, um die Zähne vor dem Austrocknen zu schützen. Die Wurzelkanäle wurden durch ein Glasplättchen abgedeckt und unter aeroben Bedingungen für 9 Tage bei 37°C inkubiert. Alle drei Tage wurde eine neue Bakteriensuspension hinzugegeben. Auch die Reinheit der *E. faecalis* Infektion wurde alle drei Tage durch entnommene Proben, die auf Agar-Platten für 24h bei 37°C inkubiert wurden, sicher gestellt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kanäle getrocknet und die Zähne in drei Gruppen und eine Kontrollgruppe, à 10 Stück, eingeteilt. Die zu untersuchenden Medikamente (Calciumhydroxidpaste ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 2% CHX, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und CHX zu gleichen Teilen) in die Kanäle gegeben. Die Kanäle der Testgruppe wurden mit Wasser gefüllt. Im Anschluss wurden die Zähne wieder für drei Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Medikamente entfernt, die Kanäle mit 10ml steriler Natriumchloridlösung gespült und getrocknet. Die Probengewinnung erfolgte durch Aufbereitung des Kanals, auf Größe 45. Die daraus resultierenden Dentinspäne wurden zusammen mit der Feile in ein Fläschchen gegeben, das bereits 10ml Medium mit desinfektionsinaktivierenden Substanzen enthielt. Diese Lösung wurde für 10sec gerüttelt und die koloniebildenden Einheiten pro ml bestimmt. Auf diese Weise wurde der Zahn bis auf Größe 60 aufbereitet. In diesem Versuch zeigte die beste desinfizierende Wirkung Gruppe 2, bei der nur CHX verwendet wurde.

2.3.2 Testmodelle mit bovinen Zähnen

Die *in vitro* Versuche mit bovinen Zähnen, die als Vorbild für viele Untersuchungen (25;42;87) gelten, wurden von HAAPASALO und ORSTAVIK durchgeführt (29;61). Hierfür wurden keine ganzen Zähne untersucht, sondern die Rinderzahnwurzel wurde in Stücke geschnitten. Diese Stücke hatten eine Höhe von 4mm, einen äußeren Durchmesser von 6mm und die Kanalöffnung wurde auf einen Durchmesser von 2,3mm erweitert. Das Wurzelzement wurde mittels eines Diamantbohrers entfernt, die Schmierschicht wurde durch eine Vorbehandlung mit 17% EDTA und anschließend 5,25% NaOCl jeweils im Ultraschallbad beseitigt. Die Zahnstücke wurden für 15min bei 121°C autoklaviert, im Anschluss in Hefeextrakt-Glukose Medium gegeben und darin für 24h bei 37°C inkubiert, um Sterilität zu gewährleisten. Dann wurden die Zahnstücke für 3 Wochen mit dem *E. faecalis* infiziert. Um daran anschließend die Desinfektionsmittel zu testen, wurde die Zahnstückaußenseite mit Nagellack bestrichen und das Stückchen mittels Wachs in einer Wellplatte befestigt. Das zu untersuchende Agens gab man nun in das Kanallumen. Die Desinfektionszeiten lagen zwischen 5min und 7 Tagen bzw. 10 Tagen. Die Proben wurden mittels Bohrern mit immer größer werdendem Durchmesser entnommen. Die so gewonnenen Dentinspäne wurden pro Bohrung in einzelnen Behältern, die Medium enthielten, gesammelt. Diese Bohrspansuspension wurde für 7 Tage inkubiert. Die Eindringtiefen für den *E. faecalis* lagen hier nach der 3 wöchigen Infektionszeit bei bis zu 1000µm, ausgehend von der Kanalinnenseite. Hierbei gab es eine dichte Besiedlung bei 300-400µm, eine leichte Infektion bei 400-500µm und einzelne Bakterien drangen bis zu 800-1000µm vor. Von der Zahnstückaußenseite her gesehen, wo die Dentinkanälchen enger sind, drangen die Bakterien nur bis in eine Tiefe von 150-200µm ein, selten auch bis 280µm.

Um die Wirksamkeit von Tetracyclin zu untersuchen, haben ROSSI-FEDELE und ROBERTS (70) frisch extrahierte Rinderzähne verwendet. Diese wurden bis zur Verwendung in 4% Formalin gelöst in Kochsalzlösung gelagert. Die apikalen 5mm der Zahnwurzel und die Zahnkrone wurden entfernt und der übrige Zahn in Stücke, von jeweils 1 Zentimeter (cm) geschnitten. Das Kanallumen wurde auf einen Durchmesser von mindestens 1,14mm erweitert. Die Schmierschicht wurde mittels EDTA und NaOCl für jeweils 4min entfernt. Drei unterschiedliche Spüllösungen wurden untersucht: steriles, destilliertes Wasser, 50%ige Ethanollösung und Tetracyclin in einer Konzentration von 30mg/ml gelöst in 50%igem Ethanol. 12 Zahnwurzeln wurden je-

weils in 10ml Brain Heart Infusion (BHI) Medium gegeben und autoclaviert. Anschließend wurden sie auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht inkubiert um Sterilität zu gewährleisten. Sechs dieser Zähne wurden mit einer *E.faecalis* JH2-2 Suspension (Tetracyclin empfindlich) beimpft und die anderen sechs Zähne mit einer *E.faecalis* T1 (Tetracyclin resistent) Suspension. Alle 12 Testzähne wurden dann für 26 Tage bei 37°C aufbewahrt. Nach dieser Inkubationszeit wurden die beiden Gruppen jeweils in drei Untergruppen aufgegliedert. Die Zähne, der jeweiligen Untergruppe, wurden mit 1ml von einem dieser drei oben genannten Testsubstanzen behandelt. Die Testsubstanz hatte dabei eine Einwirkzeit von 5min und zum Abschluss wurde der Zahn damit noch einmal durchgespült. Die Dentinprobengewinnung erfolgte mittels eines Stiftbohrsystems. Die Späne jedes Bohrers wurden jeweils in 10ml BHI Medium gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um die Reinheit zu kontrollieren wurden 10µl jeder Probe auf Antibiotika freie und Tetracyclin beinhaltende Platten gegeben. Um die Übertragung des Antibiotikums im 10ml BHI Medium zu kontrollieren, wurden zusätzlich 5 sterile, bovine Zähne mit 30mg/ml Tetracyclin behandelt und Proben, wie oben beschrieben, entnommen. Die Dentinspäne wurden wieder in 10ml BHI Medium gegeben, die mit 100µl einer *E. faecalis* JH2-2 Suspension beimpft und über Nacht inkubiert wurden. Zusätzlich wurden zwei reine BHI Medium Flaschen mit der *E.faecalis* JH2-2 beimpft. Die Ergebnisergebnisgewinnung erfolgte mittels der Polymerasekettenreaktion.

2.4. Natriumthiosulfat

Natriumthiosulfat als Pentahydrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) hat ein Molekulargewicht von 248 und hat in Wasser einen neutralen pH. Es verteilt sich in der extrazellulären Flüssigkeit und wird unverändert mit dem Urin ausgeschieden (8). Natriumthiosulfat wird in den unterschiedlichsten Bereichen verwendet. Es wurde zuerst als antichemischer Kampfstoff entwickelt (6). Man fand jedoch heraus, dass Natriumthiosulfat, selbst in höheren Dosen, ungiftig ist und nur zu Übelkeit und Brechreiz führt (6).

Natriumthiosulfat kann gegen die Toxizität von Stickstofflost, besser bekannt unter dem Namen Senfgas, verwendet werden (35). In einer Versuchsreihe von HATIBOGLU et al. (35) wurde in einer Studie mit Ratten gezeigt, dass Natriumthiosulfat, abhängig vom Zeitpunkt der Verabreichung, einen positiven Einfluss auf die Toxizität hat.

Dass Natriumthiosulfat ein Gegenmittel zu Cyanidvergiftungen darstellt, wurde zum ersten Mal von Lang 1885 gezeigt. Natriumthiosulfat war dann auch bis 1929 das einzig bekannte Gegenmittel zu Cyanid (3). Die Wirkung des Natriumthiosulfats ergibt sich aus seiner Rolle als Schwefel-Donator. Aufgrund dessen steigt die Rate der, durch das Enzym Rhodanese, katalysierten Transformation von Cyanid zu Thiocyanid (98) an. Deshalb wird Natriumthiosulfat in einer Dosierung von 75mg/kg auch als effektives prophylaktisches Gegenmittel bei einem Anstieg der Cyanid-Konzentration, aufgrund einer Nitroprussidinfusion, gegeben (41). KRAPEZ et al. (41) glauben sogar, dass es einen durchaus überlegenswerten Vorteil bringen kann, wenn man Natriumthiosulfat verabreicht, sobald es vorhersehbar ist, dass eine in den Grenzwerten liegende Dosis von Nitroprussiden gegeben wird.

Natriumthiosulfat wird darüber hinaus in der Tumorthherapie angewendet. Eine Behandlung mit Carboplatin bei Hirntumoren kann einen Hörverlust verursachen. Eine Behandlung mit Natriumthiosulfat blockiert die Zytotoxizität des Carboplatin, wie ein *in vitro* Versuch und ein Versuch mit Meerschweinchen zeigte (59).

In der Zahnmedizin wird Natriumthiosulfat bisher einzig zu Forschungszwecken verwendet. Die desinfizierende Wirkung des NaOCl wird durch Natriumthiosulfat abgestoppt, weswegen man Untersuchungen mit genauen Desinfektionszeiten durchführen kann (42;65;97). Darüber hinaus besteht keine Toxizität gegenüber den Bakterien (65).

3. Fragestellung

In dieser Arbeit soll eine gezielte Desinfektion von artifiziell infizierten, bovinen Wurzelkanälen *in vitro* untersucht werden. Unter Einbeziehung der im Literaturverzeichnis beschriebenen Punkte sollen in dieser Arbeit 3 Fragen abgehandelt werden.

- 1) Es soll ein *in vitro* Modell zur Prüfung endodontischer Desinfektionslösungen entwickelt werden
- 2) Die Tauglichkeit des Modells soll durch dessen Anwendung getestet werden. Verwendet wurde hier als Bakterium der *E. faecalis* und als Desinfektionsmittel NaOCl für verschiedene Konzentrationen und unterschiedliche Einwirkzeiten.
- 3) Durch die Verwendung von Natriumthiosulfat als Stopplösung, für die Desinfektion, sollen Abweichungen in den Ergebnissen für genaue Desinfektionszeiten und einer Desinfektion mit Nachwirkung aufgezeigt werden.

4. Material und Methode

4.1. Eingesetzter Mikroorganismus

Die für den Test benötigten Bakterien wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg bezogen.

Für die Versuche wurde verwendet:

Enterococcus faecalis ATCC 29212

4.2. Testmaterialien

Das verwendete Testmaterial, NaOCl, wurde als wässrige Lösung mit den Konzentrationen 0,5%, 1,0%, und 3,0% von der Apotheke des Klinikums der Universität Regensburg bezogen. Die Lagerung erfolgte in verschlossenen, braunen Glasfläschchen im Kühlschrank¹ bei 7,5°C.

Das verwendete Reduktionsmittel Natriumthiosulfat wurde als 22%ige wässrige Lösung selbst hergestellt. Dafür wurden 345,5g Natriumthiosulfat-Pentahydrat² in 1l destilliertem Wasser gelöst und anschließend steril filtriert. Gelagert wurde es im verschlossenen 50ml Falcon-Röhrchen³ im Kühlschrank bei 7,5°C. Die im Experiment benötigten Mengen an Testsubstanzen wurden stets mit sterilen, automatischen Pipetten⁴ entnommen.

4.3. Nährmedien

Als Medium wurde eine Nährbouillon hergestellt, die man durch Lösen von 30g des Fertigpulvers Trypticase-Soy-Broth⁵ in 1l 18Ω-Millipore Wasser aus dem Millipore-Gerät⁶ erhält. Anschließend wird die Lösung für 15min im Autoklaven⁷ bei 121°C autoklaviert.

Die für die Keimzahlbestimmung benötigten 94mm Agarplatten wurden aus Trypticase-Soy-Broth-Agar gegossen und vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des

¹ FKS 5002, Liebherr (Bulle, Schweiz)

² Fluka (Buchs, Schweiz)

³ Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

⁴ Eppendorf (Hamburg)

⁵ Becton & Dickinson (Sparks, USA)

⁶ MilliQUPplus, Millipore (Molsheim, Frankreich)

⁷ Fedegari Autoclavi (Albuzzano, Italien)

Klinikums der Universität Regensburg hergestellt. Die Platten wurden bis zu ihrer Verwendung im Laborkühlschrank (s.o.) bei 7,5°C aufbewahrt. Die Lagerdauer hat einen Zeitraum von 3 Wochen nie überschritten.

4.4. Inkubation der *E. faecalis*- Arbeitskultur

Die Temperatur für die Inkubation der *E. faecalis*- Arbeitskultur betrug 37°C, die CO₂-Konzentration, der Luftdruck und die Luftfeuchtigkeit in der Inkubationskammer wurden durch die Umgebungsatmosphäre bestimmt. Bei geschlossenem Inkubator⁸ herrschte in der Inkubationskammer Dunkelheit.

4.5. Sicherheitsvorkehrungen

Die Durchführung der Versuche erfolgte unter sterilen Laborbedingungen unter einer sterilen Werkbank⁹. Lediglich das Spalten der Zahnstücke erfolgte aus technischen Gründen außerhalb der Werkbank. Der Arbeitstisch wurde vor und nach den Arbeiten gründlich gereinigt und desinfiziert. Zur Desinfektion von nicht sterilisierbaren Arbeitsgeräten und –flächen wurde Ethanol in einer 70%igen Lösung eingesetzt. Diese wurde im Labor durch Verdünnung von Ethanol abs.¹⁰ mit 18Ω-Millipore Wasser selbst hergestellt. Bei allen Laborarbeiten wurden von der Doktorandin Schutzbrille, Schutzkittel, Nitril-Handschuhe¹¹ und Mundschutz¹² getragen. Zur Händedesinfektion vor, während und nach den verschiedenen Arbeiten, wurde Mucasept¹³ verwendet.

4.6. Herstellung einer Gefrierkultur

Um eine *E. faecalis* Gefrierkultur herzustellen, wurde eine *E. faecalis*¹⁴ Gefrierkugel aufgetaut und der Inhalt auf 4 Casoplatten¹⁵ ausgestrichen. Dabei sind pro Platte 100µl mit einem Drigalski-Spatel¹⁶ ausplattiert worden. Die Platten wurden dann für 24h im Inkubator bei 37°C bebrütet. Die 0,9% Natriumchloridlösung (NaCl, physiologische Kochsalzlösung) wurde selbst im Labor, durch Lösen der entspre-

⁸ B5060, Heraeus (Hanau)

⁹ HF 48, GelaireFlow Laboratories (Opera, Italien)

¹⁰ Chemikalienausgabe, Universität Regensburg

¹¹ Sempercare, Semperit Technische Produkte (Wien, Österreich)

¹² Sentinex Lite El, Lohmann & Rauscher (Neuwied)

¹³ Mucasept-A, Merz (Frankfurt)

¹⁴ Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

¹⁵ Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

¹⁶ Drigalski-Spatel, Edelstahl rostfrei, Lieferant VWR-Versand

chenden Mengen NaCl¹⁷ in 18Ω-Millipore Wasser, hergestellt. Am nächsten Tag gab man auf jede Platte 5ml 0,9%ige NaCl-Lösung und mit einem Drigalski-Spatel wurden die *E. faecalis*-Kulturen vorsichtig gelöst. Die Suspensionen von je 2 Platten wurden in einem 50ml Falconröhrchen aufgefangen. Anschließend wurde auf jeweils 2 Platten erneut physiologische Kochsalzlösung aufgetragen, damit die verbliebenen *E. faecalis* Kulturen gelöst werden konnten. Diese Suspension wurde nun auf die jeweils dazugehörige 2. Platte gegeben. Auch dort wurden die *E. faecalis* Reste gelöst und wieder im entsprechenden Falconröhrchen aufgefangen. Die Flüssigkeiten zentrifugierte man für 5min bei 3000 Umdrehungen (=2000g). Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Mit einer 20% DMSO-Lösung mit Medium, die man dadurch gewonnen hatte, dass man zu 18ml Trypticase-Soy-Broth-Medium 2ml Dimethylsulfoxide (DMSO)¹⁸ zugab, wurden die Bakterien resuspendiert.

So wurden aus den gewonnenen 20ml Lösung 5ml in das erste Falconröhrchen gegeben und die Bakterien wurden unter zu Hilfenahme eines Akku-Jets¹⁹ resuspendiert. Das Vorgehen für Röhrchen 2 erfolgte analog mit der Suspension aus Röhrchen 1. Falcon Nr. 1 wurde dann noch einmal mit 5ml aus der oben genannten Lösung gespült und auch das wurde in Falconnr.2 pipetiert. Am Ende erhielt man 10ml *E. faecalis* Bakteriensuspension, von der man jeweils 500µl in 20, zuvor beschriftete, Gefrier-Cryos²⁰ gab. Diese fror man bei -60°C ein. Am nächsten Tag taute man ein Cryo auf und strich jeweils 100µl auf 2 Casoplatten aus, die wieder für 24h bei 37°C in den Inkubator gegeben wurden. Dies diente am nächsten Tag als Kontrolle dafür, ob in den Gefrier-Cryos ein reiner *E. faecalis* Stamm enthalten ist. Spätestens nach 8 Tagen wurden die Cryos nach -80°C umgesetzt, wo sie bis zu ihrer Verwendung gelagert wurden.

Analog ging man vor, wenn der Vorrat an Gefrier-Cryos zu Ende ging. Es wurde ein Cryo aufgetaut, jeweils 4 Casoplatten wurden mit je 100µl bestrichen und für 24h in den Inkubator gestellt. Man brauchte somit nur zu Beginn der Versuche eine Gefrierkugel verwenden und konnte alle Bakteriengefrierportionen davon ausgehend herstellen.

¹⁷ Artikelnummer 1.06406, Merck (Darmstadt)

¹⁸ Dimethylsulfoxide Silylation Grade PIERCE brand of Perbio (Bonn)

¹⁹ Accu-Jet ® Pro, Brand (Wertheim)

²⁰ Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

4.7. Vorbereitung einer Arbeitskultur

Um eine Arbeitskultur vorzubereiten, wurde ein bei -80°C gelagertes *E. faecalis* Gefrier-Cryo aufgetaut. 100 μl wurden daraus entnommen und in einen mit Glasperlen gefüllten Erlenmayer-Kolben²¹ gegeben, der bereits 25ml steriles Trypticase-Soy-Broth Medium enthielt. Dieser Kolben wurde bei 37°C für 24h inkubiert. Vor der Verwendung der Suspension wurde sie bei 600nm Wellenlänge gegen ein steriles Medium vermessen. Dazu wurden jeweils 100 μl der jeweiligen Flüssigkeit in eine Küvette²² gegeben und diese mit Parafilm²³ verschlossen, um ein Verschütten, beim Messen der Wellenlänge, zu verhindern. Für jeden Arbeitstag an dem eine Bakteriensuspension benötigt wurde, wurde am Vortag eine solche frisch vorbereitet.

4.8. Herstellung der Wurzelstücke

Für die durchgeführten Arbeiten wurden zahlreiche Wurzelstücke von Rinderzähnen mit 4000 und 6000 μm Dicke benötigt, deren technische Herstellung im Folgenden beschrieben wird.

4.8.1 Gewinnung der Rinderzähne

Die Grundlage bildeten Rinderzähne, die aus den Unterkiefern frisch geschlachteter Rinder extrahiert wurden. Das Alter der Rinder lag zwischen 1,5 und 4,5 Jahren. Man verwendete lediglich voll entwickelte, bleibende Frontzähne. Diese wurden, zur Konservierung und um eine Austrocknung zu vermeiden, in einer 0,5%igen Chloramin T Lösung²⁴, am Extraktionstag vom Schlachthof²⁵ ins Labor gebracht.

4.8.2 Aufbereitung der Rinderzähne

Im Labor wurden die Zähne mit einem Skalpell²⁶ von den Resten des parodontalen Gewebes gesäubert und die Zahnkrone wurde ca. bis zur Hälfte mit Handstück²⁷ und Trennscheibe gekürzt. Bis zur Verwendung wurden die Zähne in frisches Chloramin T gegeben und im Kühlschrank bei 7°C aufbewahrt. Das Schneiden der benötigten Wurzelstücke erfolgte mit einem Innenloch-Sägemikrotom²⁸. Hierzu wur-

²¹ Schott (Mainz)

²² 1,5 halbmikro Küvetten, Brand (Wertheim)

²³ Pechiney (Düsseldorf)

²⁴ Artikelnummer 1.02426, Merck (Darmstadt)

²⁵ Schlachthof Fleischkontor Moksel (Furth im Wald)

²⁶ Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)

²⁷ Mikromotor: K9, KAVO, Handstück: 10A, KAVO (Biberach/Riß)

²⁸ 1600 Leitz (Wetzlar)

den die Zähne mit PalaDur Autopolymerisat²⁹ auf Objektträgern fixiert. Die Wurzelspitze stand senkrecht nach oben und nur die verbliebene Zahnkrone steckte im Kunststoff (Abb.5a). Damit die Zähne aufgrund der Hitzeentwicklung beim Abbinden des Kunststoffs keinen Schaden erlitten, wurden sie, nachdem der Kunststoff formstabil war, in kaltes Wasser gegeben.

Nach Anbringen eines gesockelten Zahnes in der Innenlochsäge, wurde die Wurzelspitze unter ständiger Wasserkühlung abgetrennt und zwar genau so viel, dass der Wurzelkanal so weit eröffnet war, dass man die Pulpa mit der Pinzette entfernen konnte. Dieses ca. 1mm dicke Zahnstückchen wurde verworfen (Abb. 5b) Die Innenlochsäge wurde anschließend so eingestellt, dass das nächste Stück eine Dicke von 4mm bekam. Dieses apikale Stückchen diente als Sterilkontrolle und wurde ebenfalls unter ständiger Wasserkühlung vom Rest der Wurzel getrennt.



Abbildung 5a: Gesockelter Rinderzahn mit halber Zahnkrone im Kunststoff

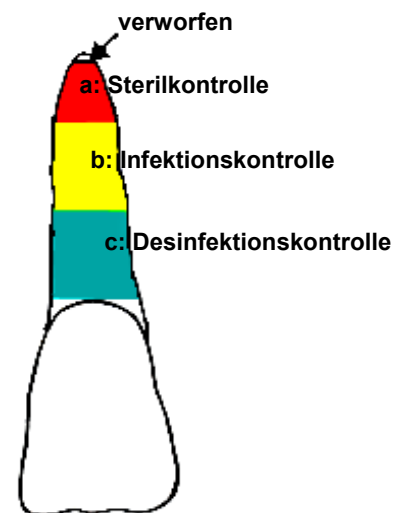


Abbildung 5b: Zahnschemata

Nach dem Abschneiden beschriftete man die gewonnene Sterilkontrolle an der Wurzelaußenseite mit Zahnnummer und a (= Sterilkontrolle). Die Beschriftung wurde mit Bleistift durchgeführt. Um eine Austrocknung bis zur Vorbehandlung zu vermeiden, wurde das Stückchen in Wasser gelegt. Die beiden, als nächstes zu schneidenden Teile umfassten in ihrer Dicke 6mm. Die Vorgehensweise bei der Abtrennung war die gleiche, wie die für a. Das auf die Sterilkontrolle folgende, mediane Stückchen der Wurzel, wurde als b (= Infektionskontrolle) bezeichnet und diente als Infektionskontrolle.

²⁹ Heraeus-Kulzer (Hanau)

Die Desinfektionskontrolle wurde als c (= Desinfektionskontrolle) bezeichnet und stammte aus dem koronalen Teil der Wurzel. Infektions- und Desinfektionskontrolle wurden ebenfalls beschriftet, analog dem Vorgehen bei a, siehe Abb.6, und wurden auch bis zur Weiterverarbeitung in Wasser gelagert. Pro Versuch wurden stets 5 Rinderzähne zugleich vorbereitet und verwendet.

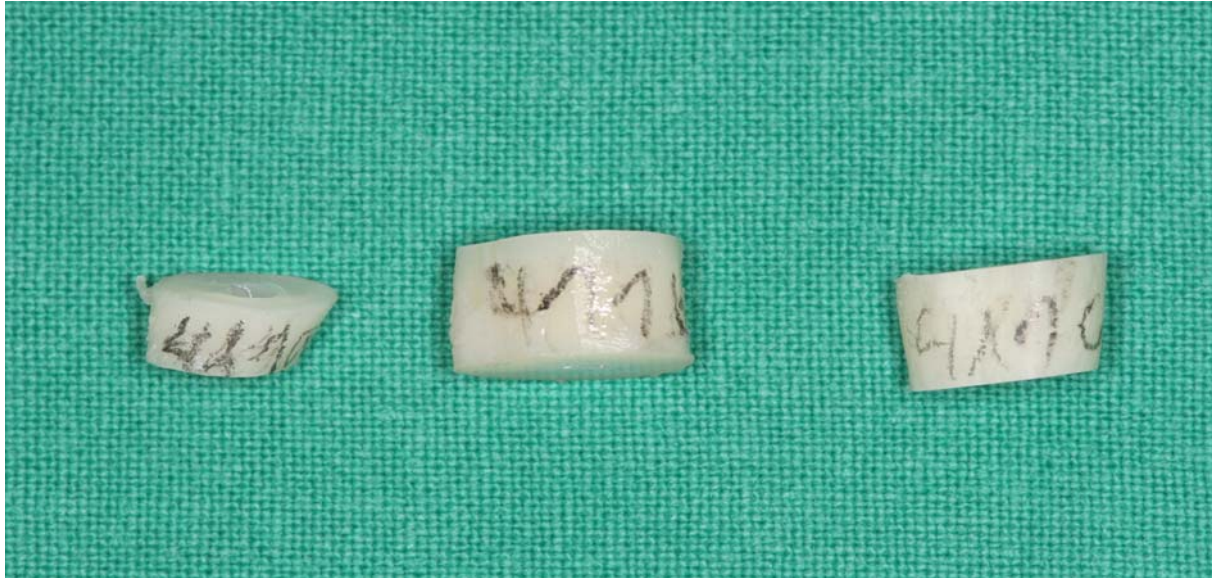


Abbildung 6: Zahnstücke a (Sterilkontrolle), b (Infektionskontrolle), c (Desinfektionskontrolle) nach dem Sägen mit Beschriftung, alle drei Teile aus einem Zahn; hier Zahnnummer 411

Nach dem Schneiden der Wurzel erfolgte die Vorbehandlung der Stückchen. Dazu wurden die Zahnstücke in eine Petrischale gestellt und das Wurzelkanallumen wurde für 10min mit 5,25%iger NaOCl-Lösung gefüllt. Anschließend folgten zwei Waschgänge zu je 5min. Dazu wurde das Zahnstückchen in ein 500ml Becherglas³⁰ gegeben. Beim ersten Waschvorgang wurde das Stückchen mit der Pinzette so gefasst, dass die Kanalöffnungen waagerecht lagen und in ve (voll entsalzenem) Wasser geschwenkt. Durch die Bewegungen floss das ve Wasser, wie durch ein Rohr, durch den Kanal. Der 2. Waschvorgang erfolgte in einem 100ml Becherglas³¹ mit frischem ve Wasser. Hier wurde nur das Glas leicht kreisend bewegt. Diese Vorbehandlung konnte man mit 4 Stückchen zeitgleich durchführen.

Nach dem Waschen wurden die Wurzelstücke entsprechend ihrer Zahnnummer in eine 100ml Schottflasche³² gegeben. Diese war mit frisch zubereitetem Medium gefüllt. Die Herstellung des Mediums erfolgte wie unter 4.3. beschrieben, allerdings war hier das Medium noch nicht autoklaviert. Waren in jeder der 5 vorbereiteten

³⁰ Schott (Mainz)

³¹ Schott (Mainz)

³² Schott (Mainz)

und beschrifteten Flaschen dann die 3 zusammengehörigen Wurzelstücke pro Zahn, so wurden diese im Medium im Autoklaven bei 121°C und 1,96bar Druck für 20min sterilisiert. Die Lagerung bis zum Gebrauch im Experiment erfolgte im Kühlschrank bei 7,5°C. Die Dauer dieser Zwischenlagerung hat 4 Tage nie überschritten.

4.9. Versuchsablauf

Alle nun durchgeführten Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um eine Kontamination der sterilen Wurzelstücke zu verhindern. Einen schematischen Überblick über den Versuchsablauf gibt Tabelle 1.

Versuchstag 1	Kleben der Zahnstücke; a mit Medium, b und c mit Bakteriensuspension befüllen; auf Rüttler in Inkubator die erste Stunde bei Stufe 200 anschließend auf Stufe 100
Nach 24h; Versuchstag 2	Mediumwechsel bei a, bei b und c wird die Bakteriensuspension gewechselt
Nach 48h; Versuchstag 3	Keine Veränderungen
Nach 72h; Versuchstag 4	Mediumwechsel bei a, bei b und c wird nach Entleeren der Suspension keine neue Bakteriensuspension hinzugegeben, auch sie werden mit Medium befüllt
Nach 96h; Versuchstag 5	Keine Veränderungen
Nach 120h; Versuchstag 6	Mediumwechsel bei a, b und c
Nach 144h, Versuchstag 7	Lösen von a und b aus den Petrischalen; Desinfektion von c; Lösen von c aus der Petrischale; Spalten der Zahnstücke; Bohren der Stücke in Tiefen von 0,5mm, 1,0mm und 1,5mm; Aufbewahrung der Bohrspäne in Medium; Ausplattieren von 100µl Bohrspansuspension auf Caso-Platten
Nach 168h; Versuchstag 8	Auszählen der Kolonien

Tabelle 1: Zeitschema

4.9.1 Versuchstag 1

Als erstes wurden alle Sterilkontrollen in Petrischalen³³ geklebt. Jedes a wurde dabei in einer eigenen Petrischale befestigt, um eine Kontamination durch b und c zu vermeiden. Das Wurzelstückchen wurde mit einer sterilen Pinzette aus der Schottflasche entnommen und mit einem sterilen Zellstofftuch³⁴ abgetupft. RelyX Unicem³⁵ wurde aktiviert, für 15sec im Kapselanmischgerät³⁶ gemischt und auf einen

³³ Größe 94/16, Cellstar Greiner bio-one (Frickenhausen)

³⁴ Novotex (Krefeld)

³⁵ 3M ESPE (Neuss)

Anmischblock gegeben. Mit einem sterilen Anmischspatel wurde soviel RelyX Unicem auf den Boden der Sterilkontrolle verteilt, dass beim Andrücken des Wurzelstückchens in die Petrischale, das Kanallumen vollkommen frei blieb. Anschließend erfolgte die zweimalige Lichthärtung. Einmal von oben und einmal von unten, für je 40sec. Erste Schritte zur Herstellung einer feuchten Kammer folgten. Eine Schicht aus 2 autoklavierten Zellstofftüchern wurde in die Schale gelegt. Dafür musste zuvor ein Loch in die Tücher geschnitten werden, so dass das Wurzelstückchen weiterhin frei in der Petrischale kleben konnte, ohne von den Tüchern berührt zu werden (Abb. 7). Nach 10min Aushärtungszeit für den Befestigungszement wurden 4ml steriles, 18Ω-Millipore Wasser auf die Zellstofftücher gegeben. Das Kanallumen der Sterilkontrolle wurde mit sterilem Medium gefüllt und mit einem Deckgläschen³⁷ der Größe 15x15 mm verschlossen (Abb.7).



Abbildung 7: Sterilkontrolle (linke Petrischale), Infektions- (rechte Petrischale, linkes Stück) und Desinfektionskontrolle (rechte Petrischale, rechtes Stück) geklebt in Petrischalen

Nach dem Kleben der Sterilkontrollen erfolgte das Kleben von b und c. Die Zahnstückchen b und c eines Zahnes wurden gemeinsam in eine Petrischale geklebt. Die geklebten Zahnstücke sind in Abbildung 7 zu sehen. Auch hier wurde nach Abwarten der Aushärtungszeit eine feuchte Kammer, bestehend aus zwei Lagen Zellstofftücher, angelegt. Die Kanallumina wurden hier mit einer *E. faecalis* Bakteriensuspension gefüllt. Diese Arbeitskultur wurde vor ihrer Verwendung im

³⁶ Silamat S3, Vivadent (Schaan, Fürstentum Liechtenstein)

³⁷ 15x15 Superior, Marienfeld (Königshofen)

Photometer³⁸ optisch, bei einer Wellenlänge von 600nm, vermessen. Lag der Wert bei 1,200 oder höher, wurde die Suspension verwendet. Nach dem Füllen mit den Bakterien wurden auch hier Deckgläser der Größe 15x15mm zum Verschließen aufgelegt.

Waren alle Zahnstücke geklebt und ihre Kanallumina mit dem entsprechenden Inhalt befüllt, so gab man die Petrischalen auf einen, im Inkubator befindlichen, Rüttler³⁹. Dieser wurde für die erste Stunde auf Stufe 200 gestellt und danach für die restliche Versuchsdauer auf 100 eingestellt. Die Temperatur im Inkubator betrug 37°C, die CO₂-Konzentration, der Luftdruck und die Luftfeuchtigkeit in der Inkubationskammer wurden durch die Umgebungsatmosphäre bestimmt. Bei geschlossenem Inkubator herrschte in der Inkubationskammer Dunkelheit. Am ersten Versuchstag musste noch die Arbeitskult, wie oben beschrieben, für den nächsten Tag angelegt werden.

4.9.2 Versuchstag 2

Nach 24h wurde zunächst bei den Sterilkontrollen das Medium gewechselt. Dazu wurde das Deckgläschen mit einer sterilen Pinzette abgenommen und die im Wurzelstück befindliche Flüssigkeit wurde mit sterilen Pipettenspitzen abpipettiert und verworfen. In das nun leere Kanallumen wurde frisches, steriles Medium gegeben. Nach dem Draufsetzen eines neuen Deckgläschens gab man noch, je nach Austrocknungsgrad, ca. 1,5-2,5ml 18Ω-Millipore Wasser bidestilliert auf die Zellstofftücher, um weiterhin den Erhalt der feuchten Kammer zu garantieren. Die Petrischale wurde wieder mit dem gleichen Deckel verschlossen. Anschließend wurde das Medium bei der nächsten Sterilkontrolle gewechselt. Nachdem bei allen a das Medium gewechselt worden war, wechselte man die Bakteriensuspension in b und c. Auch hier wurde wie am Versuchstag 1 zuerst die optische Dichte der Bakteriensuspension gemessen. Die Petrischalen wurden ebenfalls einzeln und hintereinander bearbeitet. Nach dem Entfernen und Verwerfen der Deckgläser wurde die alte Bakteriensuspension verworfen und die Kanallumina mit der frischen Arbeitskult befüllt. Es wurden neue Abdeckungen draufgegeben und wieder 1,5-2,5ml 18Ω-Millipore Wasser bidestilliert für die feuchte Kammer dazugegeben.

Bei allen Arbeitsschritten wurden stets neue sterile Pipettenspitzen bzw. Stripetten verwendet. Die benutzten Deckgläser wurden stets durch Neue ersetzt. Dieses

³⁸ Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences (Little Chalfont, Großbritannien)

³⁹ IKA-Vibrax-VXR, Janke & Kunkel GmbH (Staufen)

Vorgehen gilt für den ganzen Versuch. Nachdem alle Zahnstücke bearbeitet waren, wurden sämtliche Petrischalen zu den selben Bedingungen wie am Versuchstag auf den Rüttler (mit Einstellung 100) in den Inkubator gestellt.

4.9.3 Versuchstag 3

Am dritten Versuchstag wurde nichts verändert.

4.9.4 Versuchstag 4

Nach weiteren 48h wurde erneut das Medium in den Sterilkontrollen a gewechselt. Das Vorgehen erfolgte analog der oben beschriebenen Methode. An diesem Tag wurde der Inhalt der Infektions- und der Desinfektionskontrolle allerdings nicht durch eine neue Arbeitskultur ausgetauscht, sondern durch steriles Medium ersetzt. Dieses Medium soll die in die Dentintubuli gewanderten bzw. die an der Kanalwand anhaftenden Bakterien nähren, so dass diese wachsen und sich vermehren. Das Vorgehen war dasselbe wie oben, nur dass keine Bakteriensuspension, sondern Medium verwendet wurde.

4.9.5 Versuchstag 5

Am fünften Tag wurde nichts verändert.

4.9.6 Versuchstag 6

Nach weiteren 48h wurde das in allen Zahnstücken enthaltene Medium durch neues, steriles Medium ersetzt. Auch hier wurden die Sterilkontrollen wieder vor den Infektions- und Desinfektionskontrollen bearbeitet.

4.10. Versuchstag 7 (Versuchsende)

Nach weiteren 24h wurden erneut zuerst die Sterilkontrollen bearbeitet. Das Deckgläschen wurde entfernt und der Kanalinhalt verworfen. Das Zahnstückchen löste man mit Hilfe einer sterilen Pinzette aus der Petrischale und gab es in ein Well einer 12 Well-Platte⁴⁰, das mit 3ml steriler 0.9% NaCl-Lösung gefüllt war. Diese Lösung wurde selbst hergestellt (siehe 4.6.). Mit den Zahnstücken b wurde genauso verfahren wie mit den Sterilkontrollen a, da sie als Infektionskontrolle keiner weiteren Behandlung bedurften.

⁴⁰ Tissue Culture Cluster 12, Costar (Cambridge, USA)

4.10.1 Desinfektion

Die c-Stücke wurden je nach Versuch, mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaOCl für verschiedene Zeiten desinfiziert:

NaOCl-Konzentration	Einwirkzeiten	Stop
0,5%	30sec	Ja
	30sec	Nein
	600sec	Ja
	600sec	Nein
1,0%	30sec	Ja
	30sec	Nein
	600sec	Ja
	600sec	Nein
3,0%	30sec	Ja
	30sec	Nein
	600sec	Ja
	600sec	Nein

Nach der Desinfektionszeit wurde das Agens aus dem Kanal entnommen und auch die Zahnstücke c wurden, nach ihrer Desinfektion, in 0,9% NaCl gelegt. Pro Untersuchungsgruppe wurden 10 Zähne untersucht.

Von den 120 zu untersuchenden Zähnen wurden 60 auf die oben beschriebene Weise desinfiziert. Um zu erkennen, welchen Effekt das NaOCl das in den Dentinkanälchen verblieben war hat, wurde in das Lumen der anderen 60 c-Zahnstücke nach dem Abpipettieren der jeweiligen Desinfektionslösung, noch 22%ige Natriumthiosulfatlösung in den Kanal gegeben, um die Wirkung des NaOCl's zu stoppen. Es wurde 30sec im Kanallumen belassen und die Zahnstücke c wurden anschließend ebenfalls in physiologische Kochsalzlösung gelegt (Abb.8). Die 22%ige Natriumthiosulfatlösung wurde selbst im Labor hergestellt und anschließend steril filtriert, siehe 4.2. Um sicher zu gehen, dass das Bakterienwachstum durch Natriumthiosulfat nicht beeinträchtigt wird, haben wir einen Versuch mit Flüssigkulturen durchgeführt. Hierzu wurden 7 Caso-Platten ausgestrichen. Auf eine Kontrollplatte wurde reine *E.faecalis* Bakteriensuspension gegeben, auf 2 Platten eine Mischung von Bakteriensuspension und 22%iger Natriumthiosulfatlösung im Verhältnis 1:1. Wieder auf jeweils 2 Platten eine Mischung aus dem Verhältnis 1:2 (doppelt Natri-

umthiosulfat) und nochmals 2 Platten mit dem Verhältnis 1:3. Alle 7 Platten wurden für 24h bei 37°C inkubiert.

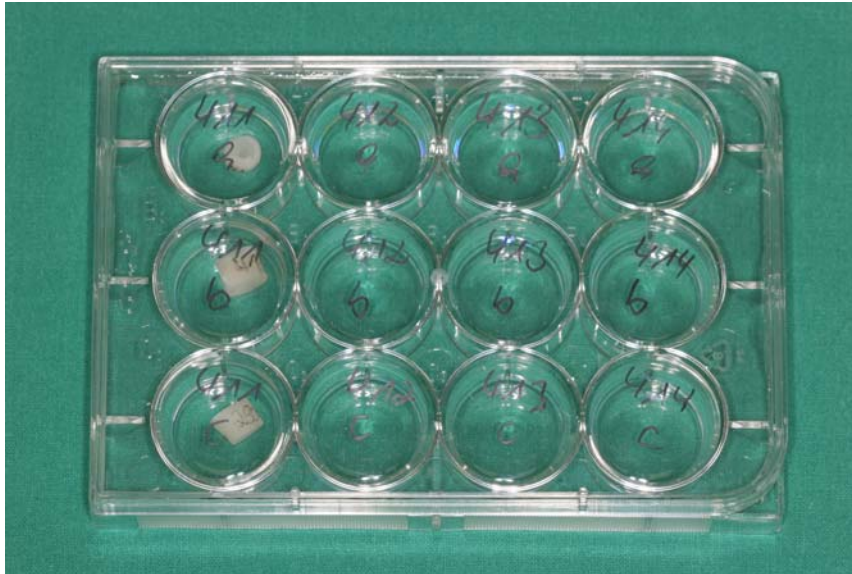


Abbildung 8: Zahnstücke nach dem Lösen aus den Petrischalen in physiologischer Kochsalzlösung

4.10.2 Herstellung der Zahnstückhälften

Unmittelbar nachdem die Zähne in NaCl eingelegt waren, wurden sie gespalten. Dies konnte aus technischen Gründen jedoch nicht unter der Sterilbank erfolgen. Wie üblich, wurde auch hier wieder mit den Sterilkontrollen begonnen. Auf einer mit 70% Alkohol gründlich gereinigten Fläche legte man sterile Tücher aus, auf die ein Zahnstück gelegt wurde. Mit einem sterilen Wachsmesser wurde die Bruchstelle am Zahn fixiert und darüber ein Tuch gegeben, das ebenfalls steril war. Nun wurde mit Hilfe eines Hammers das Zahnstückchen in zwei Hälften getrennt. Das obere Tuch diente hierbei als Schutz, damit die entstehenden Zahnteile nicht wegsprangen. Die beiden gewonnenen Hälften wurden in frisches NaCl gelegt, in dem sie unmittelbar bis zu ihrer Bohrung lagen. Nach den Sterilkontrollen wurden die Infektionskontrollen und im Anschluss die Desinfektionskontrollen gespalten und anschließend aufbewahrt. Die Tücher wurden stetig ausgewechselt, Wachsmesser und Hammer stets desinfiziert, so dass eine Kontamination von einem Zahnstück auf ein anderes vermieden wurde.

Zur Visualisierung des Eindringens der Bakterien in die Dentintubuli wurden exemplarisch einige Bilder von Zahnstücken bzw. Hälften angefertigt. Bevor die Zahnstückhälften in das Rasterelektronenmikroskop⁴¹ gegeben werden konnten, mussten sie vorbehandelt werden. Hierfür wurden die noch ungespaltenen Zahnstücke

⁴¹ FEI Quanta 400 FEG, FEI Europe B.V. Serial No. D7803 (Eindhoven, Holland)

als erstes mit 0,1 molar (M) Sørensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zahnstücke für 2h in eine Mischung aus 2,5% Glutaraldehyd⁴² in 0,1M Sørensen-Phosphat-Puffer gegeben. Nach den 2h erfolgten 3 Waschvorgänge in 0,1M Sørensen-Phosphat-Puffer für je 30min. Nach dem 3. Waschvorgang wurden die Zahnstücke erneut in 0,1M Sørensen-Phosphat-Puffer gelegt und darin im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert. Vor der Aufnahme der rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden die Zahnstücke zweimal mit Aqua bidestilliert gewaschen und anschließend auf die oben beschriebene Weise gespalten. Zur Aufnahme in das Rasterelektronenmikroskop wurden die Zahnhälften jeweils mit Leit-C-Plast⁴³ auf einem Stub⁴⁴ befestigt. Im unbeschichteten, feuchten Zustand wurden die Proben im low-vacuum-Modus untersucht. Genaue Angaben zu den einzelnen Einstellungen und Vergrößerungen können bei jedem rasterelektronischen Bild vom unteren Bildrand abgelesen werden. Abbildung 9 zeigt eine Hälfte des Zahnes 318, die den einwöchigen Versuchszyklus durchlaufen hat, nach der Spaltung. Die Aufnahme zeigt die entstandene Bruchkante und man sieht die angeschnittenen Dentintubuli mit den darin enthaltenen Bakterien.

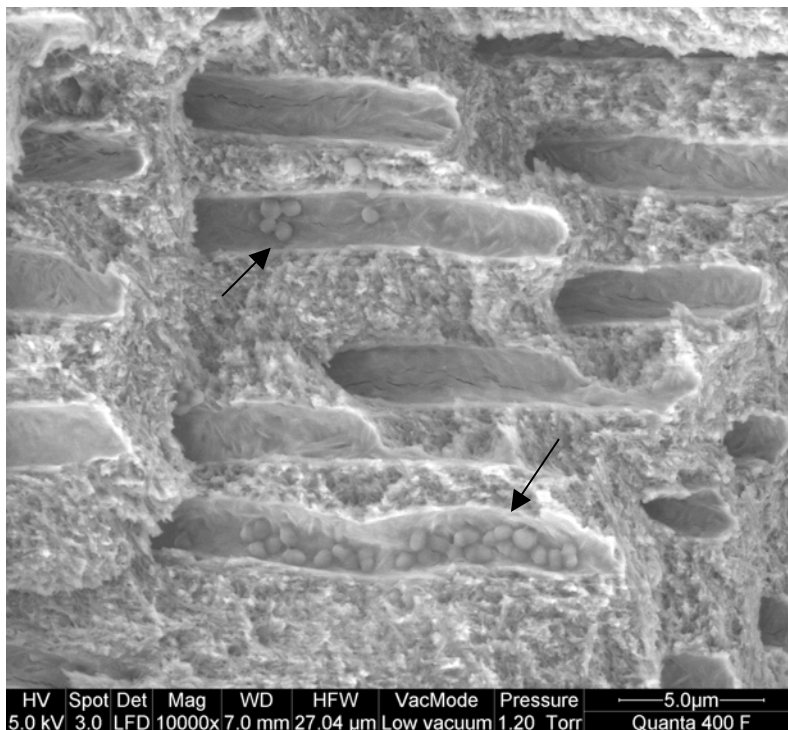


Abbildung 9: Zahn 318 nach dem einwöchigen Versuchszyklus
Dentintubuli an der Bruchkante mit Bakterien (siehe →)

⁴² Glutaraldehyd für Elektronenmikroskopie, Serva (Heidelberg)

⁴³ Leit-C-Plast, Provac (Oestrich-Winkel)

⁴⁴ Aluminium Stub, Provac (Oestrich-Winkel)

4.10.3 Probengewinnung

Für die Bohrspaltenproben wurde jeweils eine Zahnhälfte auf einem sterilen Probenteller⁴⁵ mit Hilfe von Heißkleber⁴⁶ befestigt, um einen sicheren Sitz beim Bohren zu gewährleisten, wie auf Abbildung 10 zu sehen ist. Dieser Probenteller wurde an der Bohrmaschine⁴⁷ befestigt (siehe Abb.11) und bei mittlerer Geschwindigkeit wurden mit einem sterilen Rosenbohrer⁴⁸ (Durchmesser: 0,8mm) die Bohrspäne entnommen.

Die Bohrtiefen betrugen bei den:

- Sterilkontrollen a: 1.Hälfte: 0,5mm und 1,0mm
2.Hälfte: 0,5mm und 1,5mm
- Infektionskontrollen b und Desinfektionskontrollen c:
beide Hälften in 0,5mm, 1,0mm und 1,5mm Tiefe



Abbildung 10: Zahnhälfte auf Probenteller,
die ersten beiden Bohrungen
sind verklebt



Abbildung 11: Probenteller mit
Zahn in der Bohr-
maschine

⁴⁵ G399, Plano-GmbH (Wetzlar)

⁴⁶ NO 28194, Proxxon (Niersbach)

⁴⁷ EBF600, Rotwerk Elektrowerkzeuge (Aschheim)

⁴⁸ 0,8mm Rosenbohrer, Komet (Lemgo)

Die Bohrspäne wurden in einem Falconröhrchen aufgefangen, das 2ml steriles Medium enthielt. Hierfür wurde der Probesteller leicht gekippt, über das Falcon gehalten und die Späne mit 1ml Medium, das man vorher mit einer sterilen Pipette bereits von den 2ml abgenommen hatte, ins Falcon gespült, (Abb.12). Der Bohrer, der verwendet wurde, wurde anschließend ebenfalls dazugegeben (Abb.13).

Bevor man mit einem neuen sterilen Bohrer die nächsten Späne entnahm, wurde das vorherige Bohrloch mit einem Tropfen Heißkleber verschlossen (Abb. 10). Die Zahnhälften wurden nach den Bohrungen von den Probestellern gelöst und entsorgt.



Abbildung 12: Abspülen der Bohrspäne
in das Falconröhrchen

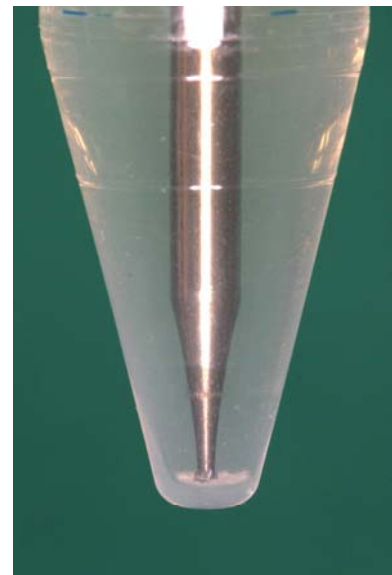


Abbildung 13: Bohrer nach dem
Abspülen im Falcon-
röhrchen

4.10.4 Wachstumskulturen

Die Falconröhrchen mit den gewonnen Bohrspänen und den Bohrern wurden für 5sec mit einem Vortex⁴⁹ aufgeschüttelt und 100µl davon auf einer Caso-Platte mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Von den Infektions- und Desinfektionsproben wurde zusätzlich, für jede Probe, eine 1:100 Verdünnung hergestellt. Alle Platten wurden im Anschluss für 24h bei 37°C inkubiert.

⁴⁹ REAX2000, Heidolph (Schwabach)

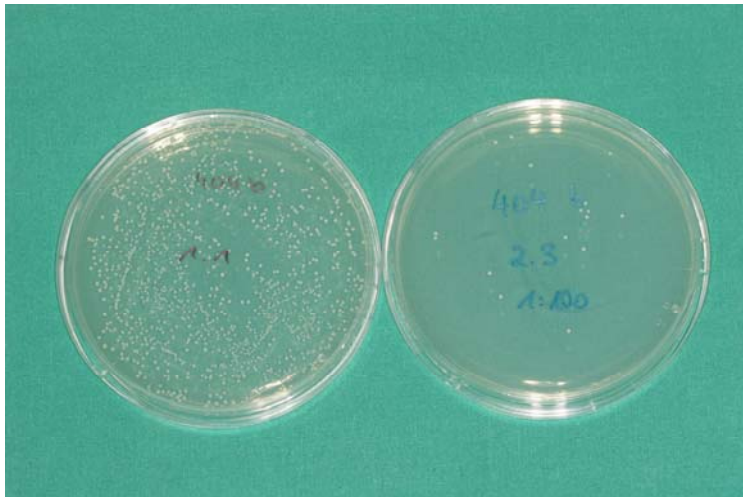


Abbildung 14: Caso-Platten (Infektionskontrollen b) nach 24h Inkubation; Original und verdünnt 1:100

4.10.5 Kolonien

Nach 24h Inkubationszeit wurden die Caso-Platten (Abb.14) aus dem Brutschrank entnommen und die auf ihnen gewachsenen Kolonien gezählt. Die Ergebnisse wurden festgehalten und später ausgewertet.

4.11. Datenerhebung und statistische Analyse

4.11.1 Auszählen der koloniebildenden Einheiten

Wie unter 4.10.5 beschrieben wurden nach einer Inkubationszeit von 24h die koloniebildenden Einheiten auf den Caso-Platten gezählt. Dazu wurden die Caso-Platten gegen einen dunklen Hintergrund gehalten. Die Ergebnisse für die Platten der Infektions- und Desinfektionskontrollen wurden falls erforderlich mit ihrem Verdünnungsfaktor multipliziert.

4.11.2 Statistische Auswertung

Die nach den oben erklärten Richtlinien erfassten Daten wurden in eine computerlesbare Form überführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 15.0⁵⁰ für Windows. Die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde mit SPSS SigmaPlot 8.0⁵¹ durchgeführt.

Pro Untersuchungsgruppe wurden zehn Stichproben untersucht. Aus diesen zehn Werten wurde der Median und das 25%- bzw. 75%-Quartil berechnet und grafisch dargestellt. Als Testparameter wurde die relative Anzahl der verbliebenen Kolonien nach Desinfektion bezogen auf die aus dem selben Zahn gewonnene

⁵⁰ SPSS Inc., Chicago (USA)

⁵¹ SigmaPlot Version 8.0, Chicago (USA)

Infektionsprobe, aufgetragen als log-Stufen Reduktion, verwendet. Das heißt, die relative Anzahl der verbliebenen Kolonien musste $\leq 0,1\%$. Die Desinfektion galt als biologisch relevant festgelegt, wenn eine Reduktion von 3 log-Stufen erreicht wurde. Dies war gelungen wenn der Mediane Wert $\leq 0,1\%$ war.

Zusätzlich wurde eine nichtparametrische, statistische Analyse. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test auf dem Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ angewendet.

5. Ergebnisse

5.1. Absolute Kolonienzahlen

5.1.1 Sterilkontrollen

Die Sterilkontrollen wiesen zu keiner Zeit eine Kontamination mit dem *E. faecalis* auf. Die ausgestrichenen Bohrspanproben, aus den Bohrtiefen von 0,5mm, 1,0mm und 1,5mm zeigten kein Wachstum auf den Caso-Platten.

5.1.2 Infektionskontrollen

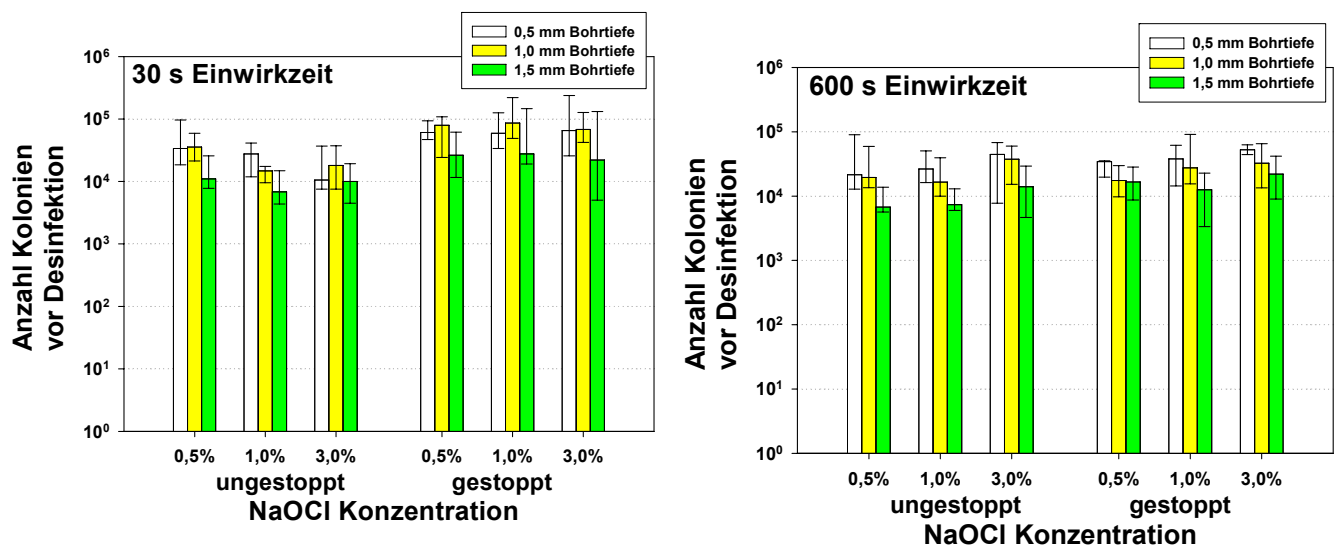


Abbildung 15: Anzahl der *E. faecalis* Kolonien auf den Caso-Platten von den Bohrspanen der Infektionskontrollen, Mediane mit 25%- und 75% Quartilen. Aufgetragen für alle Zähne, die bei der Desinfektionskontrolle mit den unterschiedlichen NaOCl-Konzentrationen für eine Dauer von 30sec (links) bzw. 600sec (rechts) behandelt wurden.

Die Anzahl der Kolonien vor der Desinfektion lag bei den Infektionskontrollen b (für ungestoppt und gestoppt), deren zugehörige Desinfektionskontrollen c später für 30sec desinfiziert wurden, zwischen $8 \cdot 10^3$ und $9 \cdot 10^4$ (Abb.15 links). Für die Infektionskontrollen b, deren Desinfektionskontrollen c später für 600sec desinfiziert wurden, lag die Anzahl der Kolonien vor Desinfektion zwischen $8 \cdot 10^3$ und $7 \cdot 10^4$ (für ungestoppt und gestoppt; Abb. 15 rechts).

5.1.3 Desinfektionskontrollen

Nach der Desinfektion mit 0,5% NaOCl für 30sec (ungestoppt) findet man je nach Bohrtiefe noch zwischen $1 \cdot 10^2$ und $1 \cdot 10^3$ Kolonien (Abb. 16 links). Anders bei der Desinfektion mit 0,5% NaOCl für 600sec (ohne Desinfektionsstop). Hier findet man nur bei einer Bohrtiefe von 0,5mm 8 Kolonien (Abb. 16 rechts). Bei der ungestoppten

Desinfektion mit 1,0% oder 3,0% für 30sec wachsen keine Kolonien mehr (Abb. 16 links). Dieses Ergebnis spiegelt das Resultat für die Desinfektion mit 1,0% und 3,0% NaOCl für eine Dauer von 600sec ohne Wirkungsstop wieder. Auch hier konnte keine Bakterienbesiedelung mehr festgestellt werden (Abb. 16 rechts).

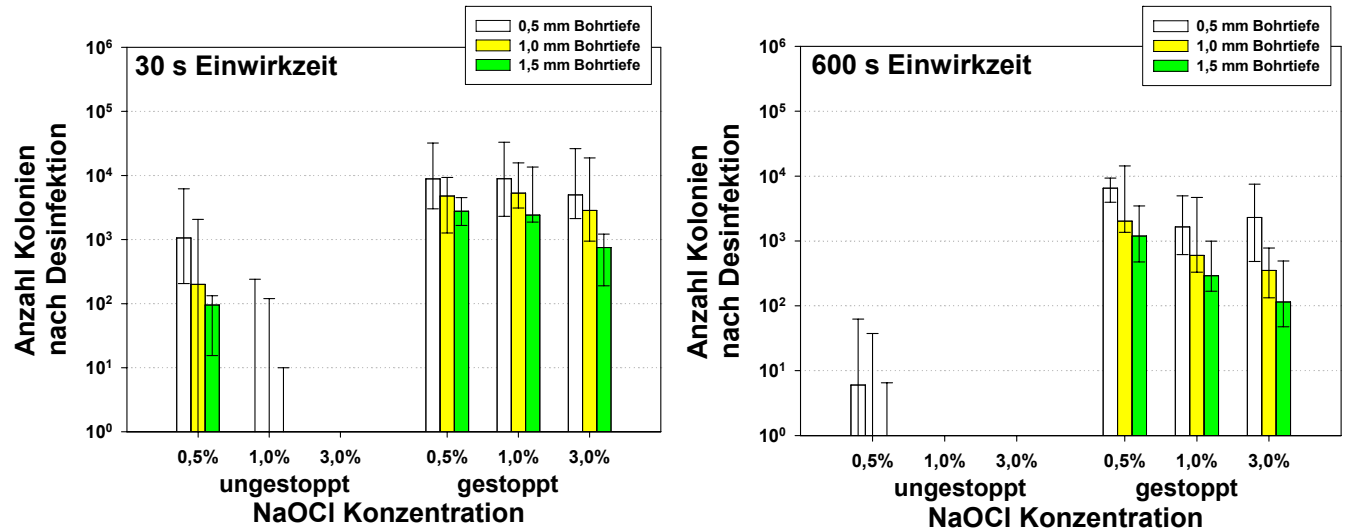


Abbildung 16: Anzahl der *E. faecalis* Kolonien auf den Caso-Platten von den Bohrspänen der Desinfektionskontrollen, Mediane mit 25%- und 75%- Quartilen. Aufgetragen für alle Zähne, mit den unterschiedlichen NaOCl-Konzentrationen, die für eine Dauer von 30sec (links) bzw. 600sec (rechts) behandelt wurden.

Anders hingegen bei den gestoppten Desinfektionsproben. Hier findet man bei einer Desinfektion mit 0,5% NaOCl für 30sec noch zwischen $4,5 \cdot 10^3$ und $9 \cdot 10^3$ Kolonien für die drei Bohrtiefen (Abb. 16 links). Bei der Desinfektion mit 1,0% für 30sec liegen die Ergebnisse in der selben Größenordnung. Hier findet man noch zwischen $3,5 \cdot 10^3$ und $9 \cdot 10^3$ Kolonien (Abb. 16 links). Und auch bei einer Desinfektion mit 3,0% für 30sec gibt es nach der Abstopfung eine Bakterienbesiedelung. Die Anzahl der hier gefundenen Kolonien betrug zwischen $8 \cdot 10^2$ und $7 \cdot 10^3$ (Abb. 16 links).

Die Anzahl der gefundenen Kolonien bei einer Desinfektion mit 0,5% NaOCl für 600sec (gestoppt) liegt zwischen $1,5 \cdot 10^3$ und $8 \cdot 10^3$ (Abb. 16 rechts). Die Anzahl der Kolonien die nach einer Desinfektion mit 1,0% und 3,0% NaOCl, mit Wirkungsabstopfung, noch gefunden wurden, liegt zwischen $1,5 \cdot 10^2$ und $3,5 \cdot 10^3$ (Abb. 16 rechts).

5.2. Relative Kolonienzahlen (aus absoluten Kolonienzahlen)

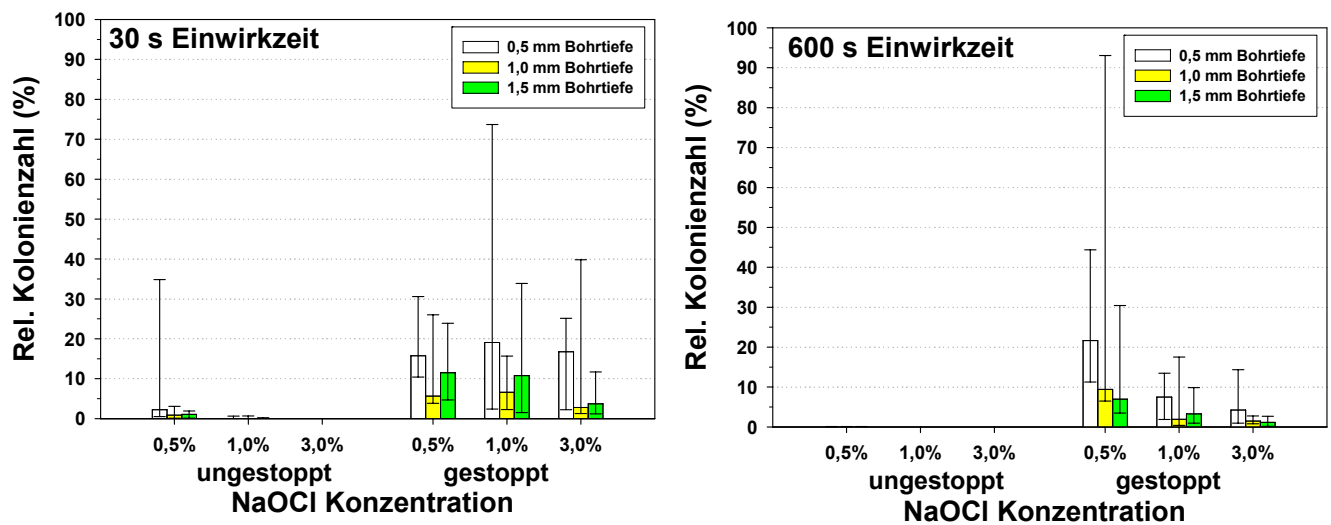


Abbildung 17: Relative Kolonienzahlen bei einer Desinfektionszeit von 30sec (links) bzw. 600sec (rechts) Mediane mit 25%- und 75%- Quartilen. 100%=Infektion der b-Stücke

Als relative Kolonienzahl ergibt sich bei der ungestoppten Desinfektion mit 0,5% NaOCl bei einer Wirkungsdauer von 30sec, in einer Bohrtiefe von 0,5mm, 2% der Ausgangsinfektion. In einer Bohrtiefe von 1,0mm fand man noch 1% und in einer Bohrtiefe von 1,5mm noch 1,5% der Ausgangsinfektion (Abb. 17 links). Bei der Desinfektion mit 1,0% und 3,0% für 30sec (ungestoppt) fand man kein Wachstum mehr (Abbildung 17 links).

Die relativen Kolonienzahlen für die ungestoppte Versuchsgruppe mit einer Desinfektionszeit von 600sec zeigen für alle Konzentrationen in allen Bohrtiefen, dass keine Bakterien mehr vorhanden sind (Abb. 17 rechts)

Die relativen Anzahlen der Kolonien bei einer Wirkungsdauer von 30sec die durch Natriumthiosulfat abgestoppt wurden, zeigen für alle drei NaOCl-Konzentrationen noch Wachstum. So liegt die relative Koloniezahl für die Desinfektion mit 0,5% NaOCl (gestoppt) in einer Bohrtiefe von 0,5mm bei 16%, in einer Bohrtiefe von 1,0mm bei 6% und in einer Bohrtiefe von 1,5mm bei 12% (Abb. 17 links). Für die gestoppte Desinfektion mit 1,0% NaOCl ergaben sich Werte von 19,5% für die Bohrtiefe von 0,5mm, 7% für die Bohrung bei 1,0mm und 11% bei der Bohrung bei 1,5mm (Abb. 17 links). Die relative Anzahl der Kolonien für die gestoppte Desinfektion mit 3,0% NaOCl ergab 17% in einer Bohrtiefe von 0,5mm, 3% für die Bohrtiefe von 1,0mm und 4% in der Bohrtiefe von 1,5mm (Abb. 17 links).

Bei einer Wirkungsdauer von 600sec mit anschließendem Wirkungsstopp zeigte sich bei der Verwendung von 0,5% NaOCl noch eine relative Koloniezahl von 22% in ei-

ner Bohrtiefe von 0,5mm, in der Tiefe von 1,0mm 10% und bei der Bohrung bei 1,5mm 7% (Abb. 17 rechts). Beim Gebrauch von 1,0% NaOCl ergaben sich als relative Kolonienzahlen 8% bei der Bohrung bei 0,5mm, 2% bei der Bohrung bei 1,0mm und 4% bei einer Bohrtiefe von 1,5mm (Abb. 17 rechts). Bei der Anwendung von 3,0% NaOCl ergaben sich noch Werte von 5% bei der Bohrung bei 0,5mm, 2% bei 1,0mm und 1% bei 1,5mm Bohrtiefe (Abb. 17 rechts).

5.3. Relative Kolonienzahlen (\log_{10} -Stufen)

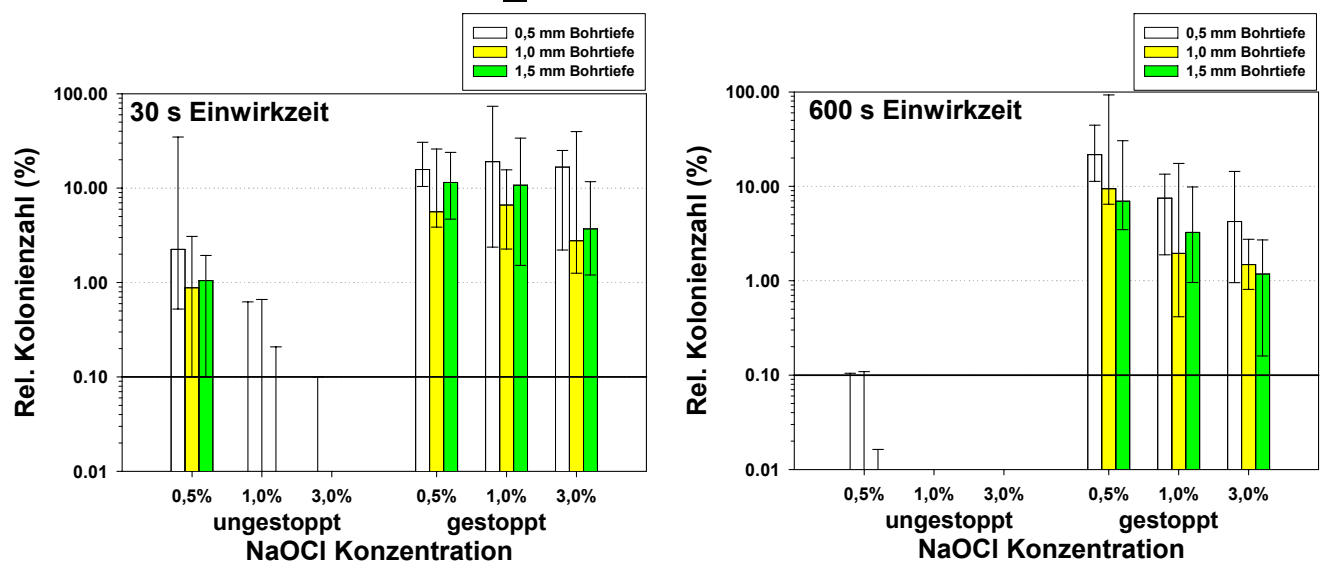


Abbildung 18: Relative Kolonienzahlen dargestellt als \log_{10} -Stufen Reduktion bei einer Desinfektionszeit von 30sec (links) bzw. 600sec (rechts), Mediane mit 25%- und 75%- Quartilen. Die Desinfektion gilt als biologisch relevant, wenn der Mediane Wert $\leq 0,1\%$ (horizontale Linie) ist, das bedeutet eine Reduktion um 3 \log_{10} -Stufen

Als relative Kolonienzahlen ergaben sich für eine Desinfektion mit 0,5% NaOCl für 30sec ungestoppt bei allen drei Bohrtiefen Werte, die größer als 0,1% waren (Abb.18 links). Da die Reduktion somit weniger als 3 \log_{10} -Stufen beträgt gilt die Desinfektion, mit diesem Agens für diese Einwirkzeit, als nicht biologisch relevant. Für die NaOCl-Konzentrationen von 1,0% und 3,0% ungestoppt waren keine koloniebildenden Einheiten mehr vorhanden (Abb.18 links). Die Desinfektion gilt somit als biologisch relevant.

Die relativen Kolonienzahlen für die ungestoppten Versuchsgruppen mit einer Desinfektionszeit von 600sec, wiesen alle keine koloniebildenden Einheiten mehr auf und liegen damit unter der 0,1% Linie (Abb. 18 rechts). Die Desinfektion für alle ungestoppten Versuche mit einer Desinfektionsdauer von 600sec gilt damit als biologisch relevant.

Die Ergebnisse der Versuche mit einer Einwirkzeit von 30sec gestoppt zeigen alle eine Reduktion auf über 1% (Abb.18 links). Die Desinfektion kann somit für keine der drei NaOCl-Konzentrationen, in keiner Bohrtiefe als biologisch relevant angesehen werden.

Die Bakterienreduktion die durch eine ungestoppte Einwirkzeit von 600sec für alle NaOCl-Konzentrationen erreicht werden konnte liegt über 1% (Abb. 18 rechts). Die Desinfektion war somit für alle ungestoppten Versuche mit einer Desinfektionsdauer von 600sec als nicht biologisch relevant anzusehen.

Eine weitergehende statistische Analyse mittels des Mann-Whitney Tests findet sich unter 8.2.

5.4. Einfluss der Natriumthiosulfatlösung auf die Bakterien

Die Kontrolle unseres Versuchs mit Flüssigkulturen zeigte, dass nach der Inkubationszeit, von 24h bei 37°C, auf allen Platten ein gleichmäßiger Bakterienrasen gewachsen war. Die Natriumthiosulfatlösung hat somit, egal in welchem Verhältnis sie hinzugegeben wurde, keinen Einfluss auf das Wachstum bzw. das Überleben der Bakterien. Das 22%ige Natriumthiosulfat konnte damit als „Stopplösung“ verwendet werden.

5.5. Rasterelektronenmikroskopische Bilder

Zur exemplarischen Visualisierung der Versuche wurden von einigen Zähnen Bilder im Rasterelektronenmikroskop erstellt. Ein Zahn, der auf die im vorderen Teil beschriebene Weise vorbehandelt wird, weist im Rasterelektronenmikroskop eine dafür typische Struktur auf. Die Dentinkanälchen sind fast alle geöffnet und somit frei zugänglich für Bakterien.

Abbildung 19 zeigt das Bild der Wurzelkanaloberfläche von Zahn 225, die vorbehandelt und autoklaviert wurde. Dieses rasterelektronenmikroskopische Bild gibt den Zustand der Wurzelkanaloberfläche vor dem Beginn des Versuchszyklus, also zum Zeitpunkt des Klebens in die Petrischale, wieder. Zum Vergleich eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Sterilkontrolle des Zahnes 354 (Abb. 20), der nach Vorbehandeln und Autoklavieren, den einwöchigen Versuchszyklus, mit ständig Medium im Kanallumen, durchlaufen hat. Hierbei kann man, beim Vergleich von Abbildung 19 und 20, Veränderungen an der Oberfläche erkennen.

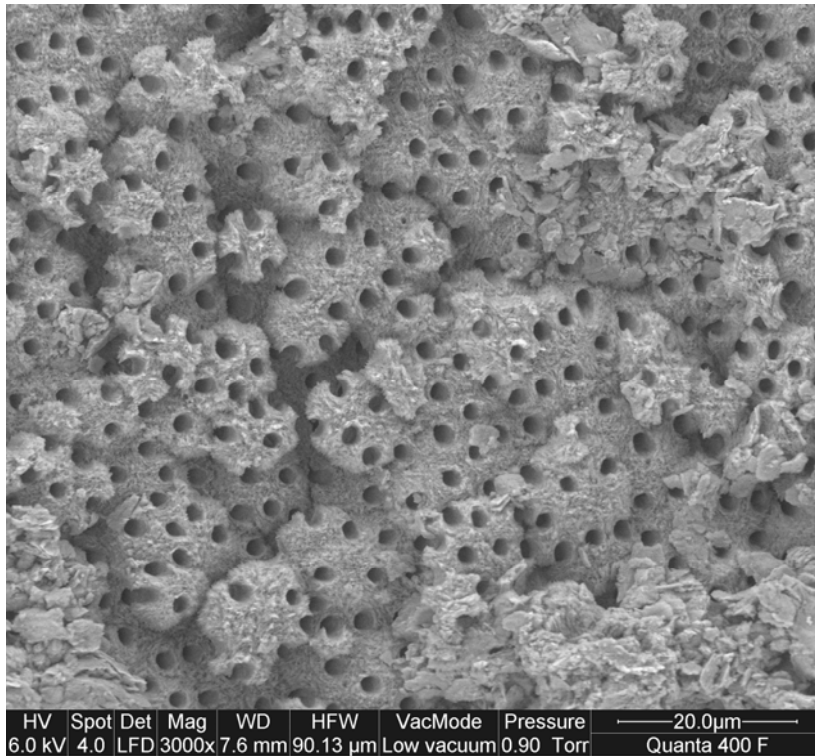


Abbildung 19: vorbehandelter, autoklavierter Zahn 225, vor dem Durchlaufen eines Versuchszyklus

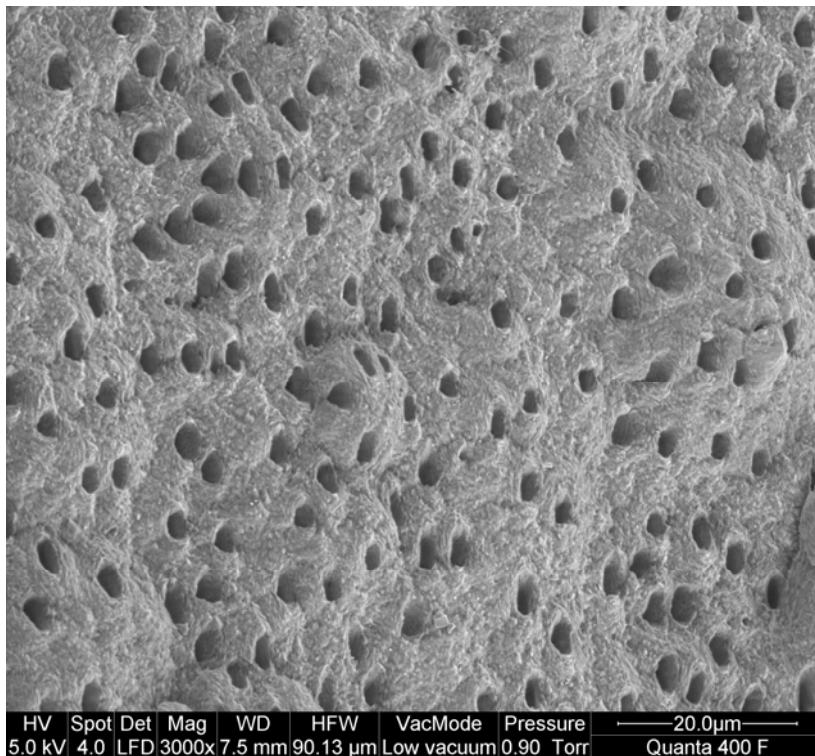


Abbildung 20: vorbehandelter, autoklavierter Zahn 354, nach Durchlaufen eines einwöchigen Versuchszyklus mit Medium
=> a Sterilkontrolle

Während auf Bild 19 die Oberfläche stark zerklüftet und scharf kantig aussieht, weist Bild 20 eine leicht wellige, fast ebenmäßige Struktur auf. Bei beiden Bildern sind alle Dentintubuli geöffnet.

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, ragen die Bakterien an einigen Stellen in die Kanäle hinein.

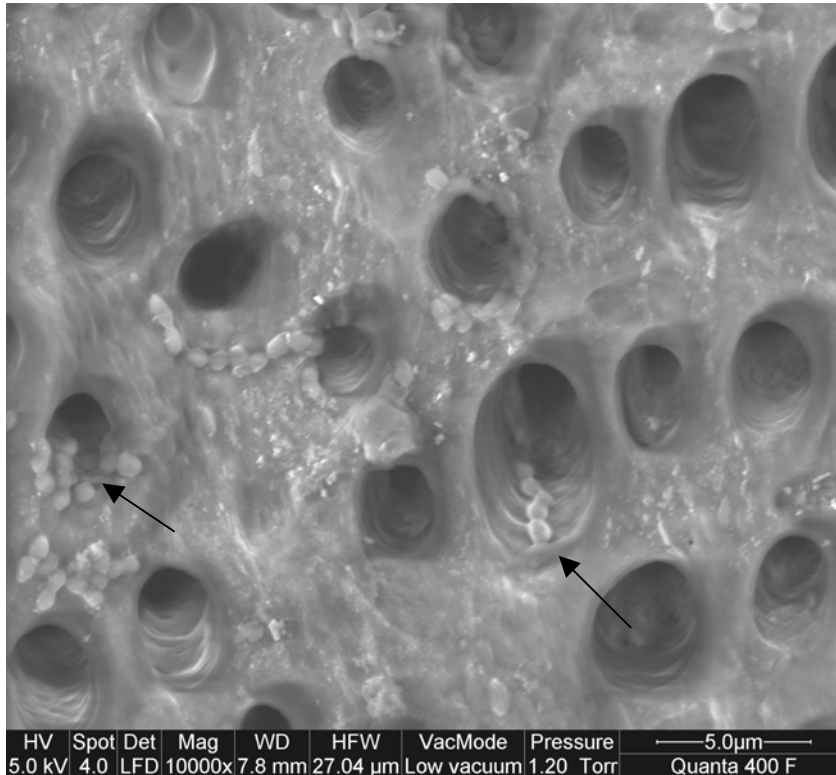


Abbildung 21: Zahnstück 318c mit Bakterien, nach Ablauf des Versuchs, nicht desinfiziert; Bakterien ragen hier in die Dentinkanäle hinein (siehe →)

Um zu sehen, ob die Bakterien wirklich als „Ketten“ in die Dentintubuli hineinragen, hat man Aufnahmen von den Bruchkanten gemacht, da hier die Kanäle, ihrer Länge nach, beim Spalten gebrochen wurden. Abbildung 22 macht deutlich, dass die Bakterien in die Dentinkanälchen hineinragen.

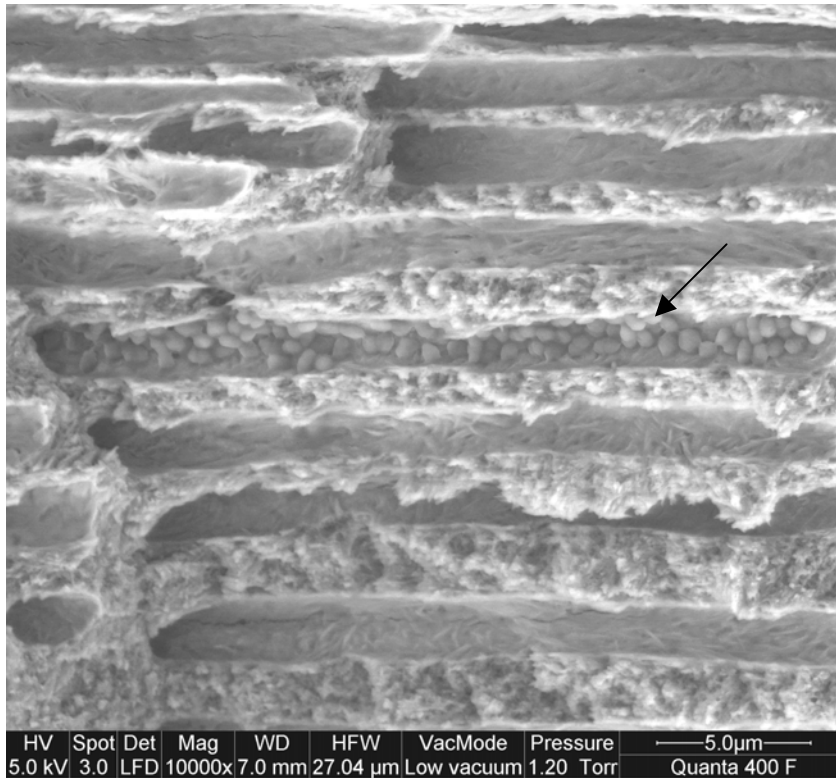


Abbildung 22: Aufsicht auf die längsgebrochenen Kanälchen an der Bruchkante mit Bakterien in den Dentintubuli (siehe →)

6. Diskussion

6.1. Der Test und seine Durchführung

Man hat sich für die Verwendung von Rinderzähnen entschlossen, da sie sehr leicht und in großer Zahl zu beschaffen sind. Darüber hinaus sind sie in ihrer Morphologie den menschlichen Zähnen sehr ähnlich. Auch die Dentinkanälchen sind, was die Größe und Dichte angeht, den menschlichen Zähnen ähnlich und es wurden selten sehr große (5-40µm) Dentinkanäle gefunden (29;31). Die Studie von SCHILKE et al. (74) zeigt ebenso, dass die Anzahl der Dentinkanälchen bei den bleibenden menschlichen Molaren und den Rinderfrontzähnen pro mm² übereinstimmend ist. Dentin von Rindern stellt bezüglich des Permeabilitätsverhaltens bei *in vitro* Tests eine gute Alternative zu menschlichem Dentin dar. Dies erwies sich in den Versuchen von SCHMALZ et al. (77).

In unserem Versuch wurden die Zahnstücke für 7 Tage mit dem Bakterium infiziert. In vielen anderen Tests war die Infektionszeit weitaus länger (17;29;40;47;73;87), sogar bis zu 3 Wochen. Doch wie die absoluten Kolonienzahlen in Abbildung 15 und 16 zeigen, scheint eine Infektionsdauer von einer Woche, im Hinblick auf die Ergebnisse der Infektion und Desinfektion, durchaus zu genügen.

Bei den Versuchen ging es darum, die Tiefenwirkung von verschiedenen NaOCl-Konzentrationen bei unterschiedlichen Einwirkungszeiten zu testen. Außerdem wollte man durch das Abstoppen der Desinfektionswirkung zusätzlich versuchen, die Wirksamkeit der in den Dentinkanälchen verbleibenden Desinfektionslösung zu untersuchen. Die zu untersuchenden Konzentrationen waren 0,5%, 1,0% und 3,0% NaOCl. Die Einwirkzeiten betrugen 30sec und 10min, die Stoppzeit lag konstant bei 30sec. Wenn man die Ergebnisse betrachtet, so kann man die Effektivität der unterschiedlichen Konzentrationen sehen. Der Unterschied die Bohrtiefen betreffend, ist allerdings anders als erwartet.

Normalerweise würde man erwarten, dass man bei einer Bohrtiefe von 0,5mm am wenigsten Bakterienkolonien zählt und bei einer Tiefe von 1,5mm am meisten; die Anzahl der koloniebildenden Einheiten also mit der Bohrtiefe zunimmt. Anhand der Ergebnistabellen sieht man allerdings, dass dies nicht der Fall ist. Die meisten Bakterien fand man bei der Bohrtiefe von 0,5 bzw. 1,0mm. Dieses Ergebnis kann

Folge des Bohrerdurchmessers, der 0,8mm beträgt, sein. Bei einer Bohrtiefe von 0,5mm wird der Durchmesser des Bohrers nicht überschritten und es lagern sich aufgrund dessen keine Bohrspäne am Schaft des Bohrers an. Bei einer Bohrtiefe von 1,5mm hingegen, lagern sich viele Bohrspäne an den geraden Bohrerschaft an. Beim Herausziehen des Bohrers, nach Erreichen der Bohrtiefe, werden dann etliche dieser Späne aufgrund der Rotation in die Luft gewirbelt. Diese Bohrspäne können nicht mehr aufgefangen werden und gehen verloren. Da dies bei einer Tiefe von 0,5mm nicht der Fall ist, könnte das ein Grund für die vermeintlich stärkere Kontamination der niedrigsten Bohrung sein.

Ein weiterer Punkt, der eventuell für die Infektionsabweichungen in Frage kommen könnte, ist das Abspülen. Hierzu werden die Probesteller aus der Halterung der Bohrmaschine genommen und über das Falconröhrchen gehalten. Anschließend werden die Bohrspäne in das Röhrchen gespült. Das Herausnehmen und das Schräghalten über dem Gefäß stellen dabei kleine Schwachstellen des Versuchs dar, bei denen eventuell Bohrspäne verloren gehen können. Bei den ersten Spülvorgängen ist die Vorgehensweise noch nicht eingeübt und die Bewegungen laufen nicht immer ruhig ab. Dieses Problem der „zitternden Hand“ ist aber durch einige Testbohrungen leicht zu beheben und verliert sich während der Vorversuche.

6.2. Antibakterielle Wirkung des NaOCl und Verwendung des Natriumthiosulfates

SPANGBERG et al. (94) haben unterschiedliche Desinfektionslösungen getestet, *in vivo* und *in vitro*. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die ideale Desinfektionslösung diejenige ist, die am wirkungsvollsten gegen Bakterien wirkt und sich zugleich am wenigsten toxisch verhält. Und obwohl NaOCl mit eines der am häufigsten verwendeten Desinfektionslösungen ist, gibt es keinen allgemeinen Richtwert bzw. keine übereinstimmende Meinung, was die wirkungsvollste Konzentration ist. SASSONE et al. (72) waren nach ihren Versuchen allerdings der Ansicht, dass eine Verwendung von 1% und 5% NaOCl die beste Wahl darstellt. Auch in diesen Versuchen wurde, unter anderem, die Wirksamkeit gegen *E. faecalis* getestet.

In unserer Versuchsreihe brachte die Desinfektion mit 3,0% NaOCl das beste Desinfektionsergebnis. Doch auch die Bakterienabtötung mit 1% NaOCl zeigt gute Ergebnisse. Dies trifft jedoch nur zu, wenn man die beiden Desinfektionslösungen

nachwirken lässt. Werden sie durch Natriumthiosulfat (5;10;27;42) abgestoppt, so ist das Desinfektionsresultat nicht optimal.

Hier sieht man, dass die Nachwirkung einen erheblichen Einfluss auf die Bakterienreduktion hat. Doch wie steht es mit der Toxizität des Natriumthiosulfates gegen die Bakterien? RADCLIFF et al. (65) haben vor der Verwendung des Natriumthiosulfates Versuche gemacht, um die Unschädlichkeit gegenüber den Bakterien sicher zu stellen. Das Ergebnis zeigte, dass das Natriumthiosulfat als Stopplösung keinen toxischen Einfluss auf die Bakterien hatte. Dieses Resultat deckt sich mit unseren Ergebnissen, siehe 4.10.1 und 5.3.

Die Versuchsergebnisse zeigen, vor allem für 1,0% und 3,0% NaOCl, dass unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen, weniger die Einwirkdauer, als vielmehr die „Nachwirkdauer“ für die Keimreduktion verantwortlich ist. Bei der Abstopfung der Desinfektion mittels Natriumthiosulfat konnten genaue Desinfektionszeiten von 30sec und 10min eingehalten werden. Hier spielte der zeitliche Rahmen, bis alle Zahnproben gebohrt worden waren, keine Rolle. Die Zeitspanne vom Ende der Desinfektion bis zum Ausplattieren der Bohrspan suspension auf die Caso-Platten betrug ca. 2h. Dies ergab sich aus dem Versuchsablauf, bei dem alle Zahnstücke gleichzeitig gespalten bzw. gebohrt wurden, um eine Kontamination von außen, durch ruhige und strukturierte Abläufe, möglichst gering zu halten. Die in den Dentinkanälchen verbliebene Desinfektionslösung wurde zwar durch das Aufbewahren in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, konnte aber trotzdem in dieser Zeitspanne, wie die Ergebnisse zeigen, noch nachwirken.

6.3. Verteilung der Dentintubuli

Eine Tendenz, für die unterschiedlichen Infektions- bzw. Desinfektionsgrade bei den Bohrtiefen, wurde in der Untersuchung von Zahnproben unter dem Rasterelektronenmikroskop gefunden. Hier zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der Dentinkanälchen innerhalb des Zahnes. Die geöffneten Dentinkanälchen waren darüber hinaus nicht gleichmäßig mit dem *E. faecalis* infiziert. Dies zeigte sich auch in anderen Studien, in denen die Dentintubuli keine gleichmäßige Besiedelung aufwiesen (29;48). So kann es durch die Bohrstelle auf der Wurzelkanaloberfläche zu verschiedenen Infektionsstärken, bei ansonsten gleicher Bohrtiefe, kommen. Bohrt man an einer Stelle, die viele offene, infizierte

Dentinkanälchen besitzt, so sind sehr viele Bakterien in den Bohrspänen, wie man am nächsten Tag auf den Caso-Platten feststellen kann. Bohrt man hingegen an einer anderen Stelle desselben Zahnstücks, so findet man 24h später wenige koloniebildende Einheiten auf den Caso-Platten. Ein Beispiel für die unterschiedliche Verteilung der Dentintubuli zeigt Abbildung 23 und Abbildung 24. Diese beiden Bilder stammen vom selben Zahnstück, sind aber an zwei unterschiedlichen Stellen aufgenommen worden. Die Bilder weisen jedoch nur eine Tendenz auf, da der Durchmesser des Bohrers mit 800µm wesentlich größer ist, als die auf den Bildern gezeigten Ausschnitte. Eine Erstellung von Bildern, bei gleicher Vergrößerung, ist in dieser Größe nur bedingt, durch das Zusammensetzen von Einzelbildern, möglich.

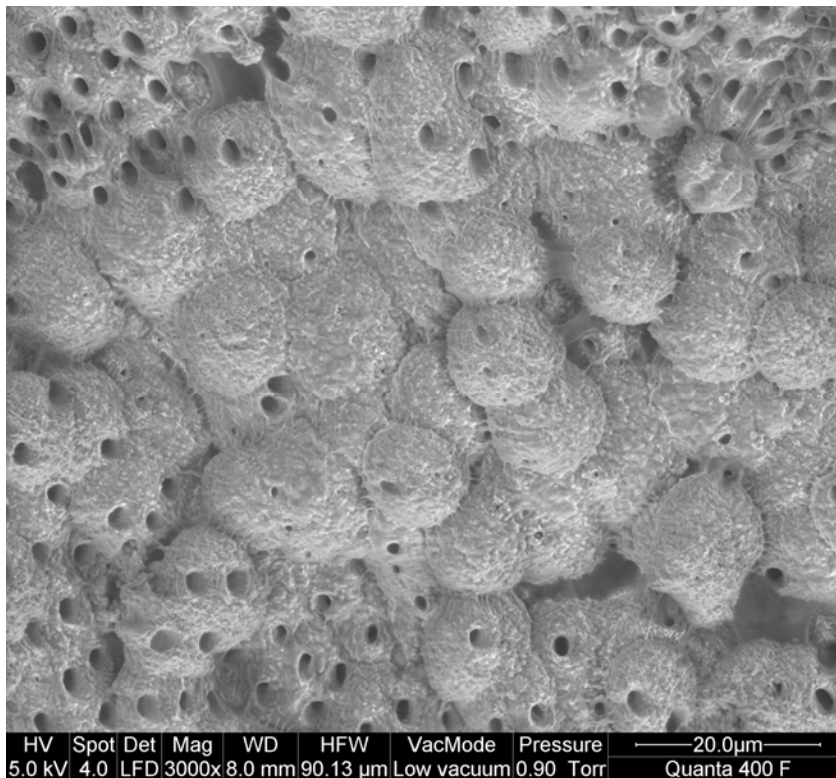


Abbildung 23: Medianes, infiziertes Zahnstück 318b (Infektionskontrolle), nach Ablauf des Versuchs

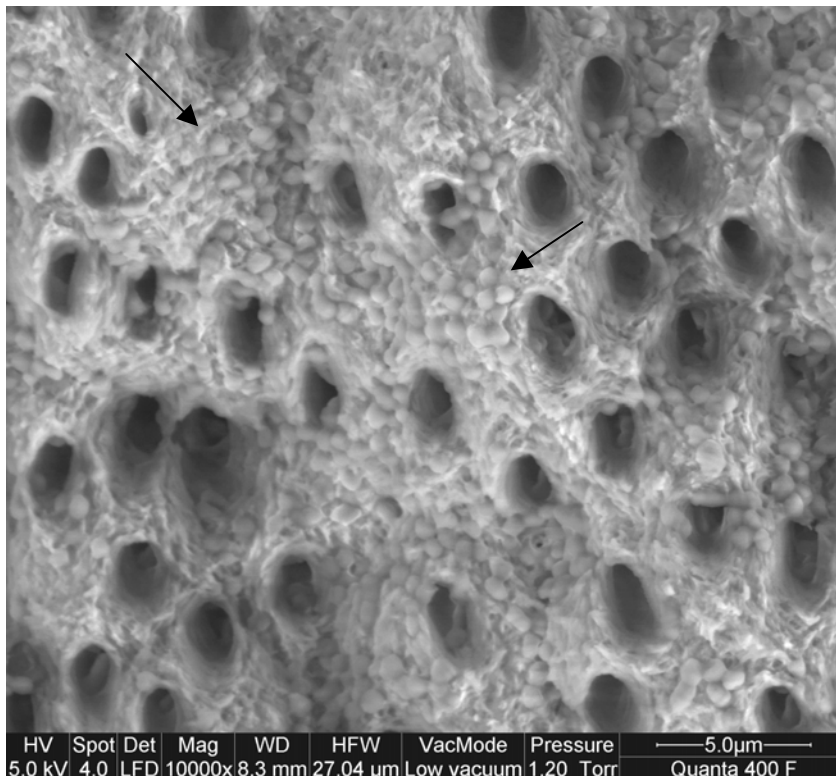


Abbildung 24: Medianes, infiziertes Zahnstück 318b (Infektionskontrolle), nach Ablauf des Versuchs, Ausschnitt mit starker Infektion (siehe →)

6.4. Vergleich der hier entwickelten Methode mit der Methode nach HAAPASALO und ORSTAVIK (29)

Viele Untersuchungen wurden, basierend auf dem Modell von HAAPASALO und ORSTAVIK durchgeführt, s. 2.3.2. Die von uns entwickelte Methode verwendet keine genormten Probenstücke, sondern belässt die Wurzel so, wie sie ist. Anders bei HAAPASALO und ORSTAVIK. Hier werden genormte Stücke verwendet. Alle Stücke waren 4mm hoch, 6mm breit und die Kanalöffnung hatte einen Durchmesser von 2,3mm. Darüber hinaus wurde auch das Wurzelzement entfernt. Die Infektion der Zahnstücke erfolgte in kleinen Röhrchen, in denen 1,5-2ml Bakteriensuspension vorhanden waren und in das die Zahnstücke gegeben wurden. Durch das Entfernen des Wurzelzements und der „schwimmenden“ Infektion der Zahnstücke, war hier eine Besiedlung von beiden Seiten möglich. Die Infektionsdauer betrug hier 3 Wochen. Aber HAAPASALO und ORSTAVIK berichten von Proben, die nur eine bzw. zwei Wochen infiziert worden waren und es zeigte sich kein großer Unterschied zu den für drei Wochen infizierten Zahnstücken. Deshalb weisen die beiden Autoren in ihrem Artikel auf eine mögliche kürzere Einwirkzeit hin. Vor der Verwendung der Desinfektionsmittel wurden die Wurzelaußenseiten mit Nagellack eingestrichen um

eine Desinfektion von beiden Seiten zu verhindern. Zur Desinfektion wurde das Zahnstück bei HAAPASALO und ORSTAVIK in einem Well einer Zellkulturplatte befestigt, allerdings wurde soviel Desinfektionslösung hinzugegeben, dass das ganze Zahnstück bedeckt war. Durch das Belassen des Wurzelzements und das Auffüllen des Kanallumens mit Bakteriensuspension bzw. Desinfektionsagens, brauchte man in unserem Versuch keine zusätzlichen Maßnahmen ergreifen, um eine Infektion bzw. Desinfektion von außen zu vermeiden. In unserem Versuch erfolgte eine gezielte Infektion bzw. Desinfektion durch das Kanallumen. Die Probenentnahme erfolgte bei HAAPASALO und ORSTAVIK nicht durch Bohrungen in bestimmten Tiefen, sondern durch das Vergrößern des Durchmessers des Kanallumens. Hierzu wurden Bohrer für das Handstück verwendet. Die verwendeten Bohrergrößen waren ISO 023 bis ISO 050. Die so gewonnen Späne wurden in BHI Medium für sieben Tage inkubiert. In diesem Versuch fiel der Arbeitsschritt der Spaltung der Zahnstücke weg. Dies bedeutet eine Verminderung der Kontaminationsgefahr, da dieser Schritt nicht unter der Sterilbank durchgeführt werden konnte. Die Spangewinnung bei HAAPASALO und ORSTAVIK bedingt einen Abrieb an der gesamten Wurzelkanaloberfläche. Die unter 6.3. angedachten Tendenzen der ungleichmäßigen Tubuliverteilung und –besiedlung würden bei diesem Vorgehen keine Rolle spielen, da sie wahrscheinlich für jede Bohrung gleich vorhanden wären.

7. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, ein Modell für die *in vitro* Prüfung von endodontischen Desinfektionsmitteln zu entwickeln. Die Eignung des Modells sollte durch die Anwendung von verschiedenen Konzentrationen von NaOCl (0,5%, 1,0% und 3,0%) gezeigt werden. Eine Abstopfung der Desinfektionswirkung mit Natriumthiosulfat sollte einen möglichen Unterschied zwischen einer gestoppten und einer ungestoppten Reaktion zeigen.

Für diesen Versuch verwendete man ausschließlich NaOCl als Desinfektionsmittel und das Bakterium *E. faecalis* für die Infektion. Die angewendeten NaOCl-Konzentrationen waren 0,5%, 1,0% und 3,0%. Die Einwirkzeiten in den Lumina, der eine Woche lang infizierten Zahnstücke, lag bei 30sec und 10min. Eine Woche Infektionszeit erscheint ausreichend, um eine Infektion der Zähne zu erreichen.

Bei der Hälfte der Proben wurde ein Wirkungsstop mittels Natriumthiosulfat vorgenommen. Die Probengewinnung erfolgte mit Hilfe einer Ständerbohrmaschine, mit der Bohrungen in Tiefen von 0,5mm, 1,0mm und 1,5mm gemacht wurden. Die so gewonnenen Späne wurden mit einem Milliliter Medium in ein Falconröhrchen (pro Bohrung ein extra Falcon) gespült. Dieses Röhrchen enthielt nochmals 1ml steriles Medium und die so gewonnene 2ml Bohrspansuspension wurde anschließend mit einem Vortex gemischt und 100µl wurden jeweils auf Caso-Platten in unterschiedlichen Verdünnungen aufgebracht. Die Platten wurden für 24h inkubiert und die gewachsenen Kolonien gezählt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels dem Mann-Whitney-Test.

Die ungestoppten Versuche, mit einer Einwirkdauer von 600sec, waren für alle drei NaOCl-Konzentrationen frei von Infektion. Betrachtet man die Ergebnisse für die abgestoppten Versuche, so sieht man, dass selbst bei einer Einwirkzeit von 10min auch für die NaOCl-Konzentration von 3,0% noch keine Reduktion um 3 log-Stufen erreicht wurde. Es zeigt sich sogar, dass es unter den gestoppten Versuchen keinen signifikanten Unterschied macht, ob sie für 30sec oder 10min desinfiziert wurden ($p > 0,05$). Die gefundenen koloniebildenden Einheiten liegen hier bei beiden zwischen $1,5 \cdot 10^2$ und $9 \cdot 10^3$.

Es konnte somit gezeigt werden, dass das in den Dentinkanälchen verbliebene Desinfektionsagens einen signifikanten Einfluss auf die Bakterienreduktion hat. Aufgrund dieser Nachwirkung konnte bereits bei einer Einwirkzeit von 30sec für 1,0% und 3,0% Keimfreiheit erzielt werden.

8. Anhang

8.1. Labormaterialien und Reagenzien

Bakterien

Enterococcus faecalis ATCC 29212, bezogen vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

Agar

Tryptic Soy Broth Fertigmischung, *Becton & Dickinson (Sparks, USA)*

30g werden zu einem Liter 18Ω-Millipore-Wasser hinzugegeben

Zusammensetzung pro 1l:

- 17,0 g pankreatisch abgebautes Casein
- 3,0 g enzymatisch abgebautes Sojamehl
- 2,5 g Dextrose
- 5,0 g Natriumchlorid
- 2,5 g Dikaliumphosphat

Arbeitsschutz

Handschuhe: SemperCare, *Semperit Technische Produkte (Wien, Österreich)*

Semper med supreme, Latex powderfree, *Technische Produkte (Wien, Österreich)*

Mundschutz: Sentinex Lite EI, *Lohmann & Rauscher (Neuwied)*

Handdesinfektion: Mucasept-A, *Merz (Frankfurt)*

Flächendesinfektion: Ethanol 70%, *Chemikalienausgabe Universität Regensburg*

Aufbewahrung

Laborkühlschränke: FKS5002, *Liebherr (Bulle, Schweiz)*

Tiefkühlschränke: Forma -86 Freezer, *Thermo Electron Corp. (Marietta, USA)*

Messgeräte

Photometer: Ultrospec 3300 pro, *Amersham Biosciences (Little Chalfont, GB)*
 Küvetten: 1,5 halbmikro Küvetten, 12,5mmx12,5mmx45mm, *Brand (Wertheim)*
 Messpipetten: *Eppendorf (Hamburg)*
 Costar Stripette: *(Corning, New York)*
 Analysenwaage: Sartorius *(Göttingen)*
 Accu-Jet ® pro: *Brand (Wertheim)*

Zahnstückeherstellung

Schlachthof: Fleischkontor Moksel *(Furth im Wald)*
 PalaDur Autopolymerisat: *Heraeus-Kulzer (Hanau)*
 Sägemikrotom: 1600 *Leitz (Wetzlar)*
 Mikromotor: K9 , KAVO *(Biberach/Riß)*
 Handstück: 10A KAVO Handstück 180C *(Biberach/Riß)*

Chemikalien

Hypochlorit 100ml Lösung 5,25%, *Speiko (Bielefeld)*
 Natriumhypochlorit 0,5%, 1% und 3% *Apotheke der Universitätsklinik Regensburg*
 Natriumthiosulfat-Pentahydrat 72050 puriss.p.a.cryst., *Fluka (Buchs, Schweiz)*
 Natriumchlorid 1,06406,1000, *Merck (Darmstadt)*
 DMSO Dimethylsulfoxide Silylation Grade *PIERCE brand of Perbio (Bonn)*
 Chloramin T: 1.02426, *Merck (Darmstadt)*
 Glutaraldehyd für Elektronenmikroskopie 2,5%, *Serva (Heidelberg)*
 Sørensen-Phosphat-Puffer 0,1M

Verbrauchsmaterialien

Zellstofftücher: Mehrzwecktücher, *Novotex (Krefeld)*
 Petrischalen: Größe 94/16 steril für Gewebekulturen, *Cellstar Greiner bio-one (Frickenhäusen)*
 Eppendorfcups: *Eppendorf (Hamburg)*
 Falcon tubes: 15ml PP-Test tubes, *Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)*
 Cryos: *Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)*
 Deckgläser: 15x15 Superior, *Marienfeld (Königshofen)*

Bohrer: 0,8mm Rosenbohrer, *Komet (Lemgo)*

Probenteller: Probenteller Alu für REM G399 Durchmesser 25mm, *Plano-GmbH (Wetzlar)*

Wellplatten: Tissue Culture Cluster 12, *Costar (Cambridge, USA)*

Pipettenspitzen: 30µl, 200µl, 1000µl, *Sarstedt (Nümbrecht)*

Skalpell: *Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)*

Heißklebesticks: NO 28194, *Proxxon (Niersbach)*

Parafilm: *Pechiney (Düsseldorf)*

RelyX Unicem: *3M ESPE (Neuss)*

Aluminium Stub: *Provac (Oestrich-Winkel)*

Leit-C-Plast: *Provac (Oestrich-Winkel)*

Sonstige Geräte

MilliQUFplus: *Millipore (Molsheim, Frankreich)*

Sterile Werkbank HF48: *GelaireFlow Laboratories (Opera, Italien)*

Lampe: Optilux 400, *Demetron (Danbury, USA)*

Bohrmaschine: Rotwerk Bohr/Fräsmaschine EBF600, *Rotwerk Elektrowerkzeug (Aschheim)*

Heißklebepistole: HKP220, *Proxxon (Niersbach)*

Autoklav: *Fedegari Autoclavi (Albuzzano, Italien)*

Drigsalski-Spatel: Edelstahl rostfrei, Lieferant VWR-Versand

Rüttler: IKA-Vibrax-VXR, *Janke & Kunkel GmbH (Staufen)*

Kapselanmischgerät: Silamat S3, *Vivadent (Schaan, Fürstentum Liechtenstein)*

Inkubator: B5060, *Heraeus (Hanau)*

Vortex: REAX2000, *Heidolph (Schwabach)*

Rasterelektronenmikroskop: FEI Quanta 400 FEG, *FEI Europe B.V. (Eindhoven, Holland)*

Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Sigma Plot Version 8.0, *SPSS Inc. (Chicago, USA)*

SPSS Version 15.0, *SPSS Inc. (Chicago, USA)*

8.2. Signifikanztabellen

Die folgenden Signifikanztabellen stellen die Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels des Mann-Whitney Tests dar. Als Parameter wurden ausschließlich die relativen Kolonienzahlen verwendet.

8.2.1 *Signifikanzauswertung für die verschiedenen NaOCl-Konzentrationen gegeneinander*

			NaOCl-Konzentrationen gegeneinander		
Einwirkdauer (s)	Bohrtiefen (mm)	Stop	0,5:1	0,5:3	1:3
30	0,5	Ja Nein	ns 0,022	ns 0,000	ns 0,43
	1	Ja Nein	ns ns	ns 0,007	ns 0,013
	1,5	Ja Nein	ns 0,043	ns 0,02	ns ns
600	0,5	Ja Nein	0,035 ns	0,029 ns	ns ns
	1	Ja Nein	ns ns	0,000 ns	ns ns
	1,5	Ja Nein	ns ns	0,002 ns	ns ns

Tabelle 2: Die verschiedenen NaOCl-Konzentrationen gegeneinander. In der oberen Hälfte stehen jeweils die Ergebnisse für eine Einwirkzeit von 30sec, die untere Hälfte zeigt die Signifikanzen für 600sec. Die Zahlen geben die p-Werte an ($p \leq 0,05$), ns bedeutet nicht signifikant ($p > 0,05$).

8.2.2 Signifikanzauswertung für den Desinfektionswirkungsstop JA/NEIN gegeneinander

Bohrtiefen (mm)	NaOCl-Konzentration (%)	Einwirkdauer (s)	Stop ja/nein
0,5	0,5	30	ns
		600	0,000
	1	30	0,000
		600	0,000
	3	30	0,000
		600	0,000
1	0,5	30	0,004
		600	0,000
	1	30	0,001
		600	0,000
	3	30	0,000
		600	0,000
1,5	0,5	30	0,000
		600	0,000
	1	30	0,000
		600	0,000
	3	30	0,000
		600	0,000

Tabelle 3: Desinfektionswirkungsstop JA/NEIN gegeneinander Im oberen Drittel stehen die Ergebnisse bei einer Bohrtiefe von 0,5mm für alle NaOCl-Konzentrationen. Im mittleren Drittel für 1,0mm Bohrtiefe und im letzten Drittel für 1,5mm Bohrtiefe, für alle NaOCl-Konzentrationen. Die Zahlen geben die p-Werte an ($p \leq 0,05$), ns bedeutet nicht signifikant ($p > 0,05$).

8.2.3 Signifikanzauswertung für die Zeiten 30 Sekunden und 600 Sekunden gegeneinander

NaOCl-Konzentration (%)	Bohrtiefen (mm)	Stop	Einwirkdauer gegeneinander
			30s:600s
0,5	0,5	Ja Nein	ns 0,002
	1	Ja Nein	ns 0,023
	1,5	Ja Nein	ns 0,007
1	0,5	Ja Nein	ns 0,43
	1	Ja Nein	ns 0,013
	1,5	Ja Nein	ns ns
3	0,5	Ja Nein	ns ns
	1	Ja Nein	ns ns
	1,5	Ja Nein	ns ns

Tabelle 4: Die beiden Einwirkungszeiten 30sec/600sec gegeneinander, für alle Zähne. Im obersten Drittel stehen die Ergebnisse für eine Desinfektionskonzentration von 0,5% für alle Bohrtiefen. Im mittleren Drittel stehen die Signifikanzen für 1,0% NaOCl und im untersten Teil für 3,0% NaOCl, für alle Bohrtiefen. Die Zahlen geben die p-Werte an ($p \leq 0,05$), ns bedeutet nicht signifikant ($p > 0,05$).

9. Literaturverzeichnis

- (1) Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of Two *Enterococcus faecalis* Phenotypes to Root Canal Medications. *Journal of Endodontics* 2005 Jan;31(1):30-6.
- (2) Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *International Endodontic Journal* 1999;32(2):99-102.
- (3) Baskin SI, Horowitz AM, Nealley EW. The antidotal action of sodium nitrite and sodium thiosulfate against cyanide poisoning. *J Clin Pharmacol* 1992 Apr 1;32(4):368-75.
- (4) Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *International Endodontic Journal* 2006;39(1):10-7.
- (5) Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1983 Mar;55(3):307-12.
- (6) Cardozo RH, Edelman IS. The volume of distribution of sodium thiosulfate as a measure of the extracellular fluid space. *J Clin Invest* 1952 Mar;31(3):280-90.
- (7) Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 2001 Oct;92(4):446-50.
- (8) Cicone JS, Petronis JB, Embert CD, Spector DA. Successful treatment of calciphylaxis with intravenous sodium thiosulfate. *American Journal of Kidney Diseases* 2004 Jun;43(6):1104-8.
- (9) Coates D, Death JE. Use of buffered hypochlorite solution for disinfecting fibrescopes. *J Clin Pathol* 1982 Mar 1;35(3):296-303.
- (10) Coldero LG, McHugh S, MacKenzie D, Saunders WP. Reduction in intracanal bacteria during root canal preparation with and without apical enlargement. *International Endodontic Journal* 2002;35(5):437-46.
- (11) Cozean C, Arcoria CJ, Pelagalli J, Powell GL. Dentistry for the 21st century? Erbium:YAG laser for teeth. *J Am Dent Assoc* 1997 Aug 1;128(8):1080-7.
- (12) Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiology and Immunology* 2000;15(5):309-12.

- (13) Driscoll CO, Dowker SEP, Anderson P, Wilson RM, Gulabivala K. Effects of sodium hypochlorite solution on root dentine composition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002 Feb 1;13(2):219-23.
- (14) Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative Evaluation of Endodontic Irrigants against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *Journal of Endodontics* 2006 Jun;32(6):527-31.
- (15) Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial Activity of 2% Chlorhexidine Gluconate and 5.25% Sodium Hypochlorite in Infected Root Canal: In Vivo Study. *Journal of Endodontics* 2004 Feb;30(2):84-7.
- (16) Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13(2):113-7.
- (17) Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *International Endodontic Journal* 2007;40(2):85-93.
- (18) Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe JO. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995;6(2):85-90.
- (19) Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Brazilian Dental Journal* 2003;14:58-62.
- (20) Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal* 2002 Mar 6;35(3):221-8.
- (21) Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982 Jun;90(3):200-6.
- (22) Fouad A, Zerella J, Barry J, Spangberg L. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2005 Jan;99(1):112-8.
- (23) Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal of Endodontics* 2007 Jul;33(7):852-5.
- (24) Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 2001;34(6):424-8.
- (25) Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against

Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. International Endodontic Journal 2003;36(4):267-75.

- (26) Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2006 Aug;102(2):247-53.
- (27) Gomes BPFA, Vianna ME, Matsumoto CU, de Paula e Silva Rossi V, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2005 Oct;100(4):512-7.
- (28) Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, Gulabivala K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. International Endodontic Journal 2001;34(2):113-9.
- (29) Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res 1987 Aug 1;66(8):1375-9.
- (30) Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. Acta Odontol Scand 1983;41(1):19-22.
- (31) Hals E, Cato OH. Scanning electron and incident light microscopy of giant tubules in red deer dentin. Scand J Dent Res 1984 Aug;92(4):269-74.
- (32) Hamilton JC, Dennison JB, Stoffers KW, Welch KB. A clinical evaluation of air-abrasion treatment of questionable carious lesions. A 12-month report. J Am Dent Assoc 2001 Jun;132(6):762-9.
- (33) Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics 2001 May;91(5):579-86.
- (34) Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. J Endod 1988 Mar;14(3):125-7.
- (35) Hatiboglu I, Mihich E, Moore GE, Nichol CA. Use of sodium thiosulfate as a neutralizing agent during regional administration of nitrogen mustard: an experimental study. Ann Surg 1962 Dec;156:994-1001.
- (36) Heling I, Rotstein I, Dinur T, Szwec-Levine Y, Steinberg D. Bactericidal and Cytotoxic Effects of Sodium Hypochlorite and Sodium Dichloroisocyanurate Solutions In Vitro. Journal of Endodontics 2001 Apr;27(4):278-80.
- (37) Hidalgo E, Dominguez C. Growth-altering effects of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts. Life Sciences 2000 Aug 8;67(11):1331-44.

- (38) Jones LA, Jr., Hoffman RK, Phillips CR. Sporocidal activity of sodium hypochlorite at subzero temperatures. *Appl Microbiol* 1968 May;16(5):787-91.
- (39) Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004 Sep 1;15(5):308-20.
- (40) Khademi Aa, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Australian Endodontic Journal* 2006;32(3):112-5.
- (41) Krapez JR, Vesey CJ, Adams L, Cole PV. Effects of cyanide antidotes used with sodium nitroprusside infusions: sodium thiosulphate and hydroxocobalamin given prophylactically to dogs. *Br J Anaesth* 1981 Aug 1;53(8):793-804.
- (42) Krause TAD, Liewehr FRD, Hahn C-LPD. The Antimicrobial Effect of MTAD, Sodium Hypochlorite, Doxycycline, and Citric Acid on *Enterococcus faecalis*. [Miscellaneous Article]. *Journal of Endodontics* 2007 Jan;33(1):28-30.
- (43) Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *Journal of Endodontics* 1998 Jul;24(7):472-6.
- (44) Lewis MA, MacFarlane TW, McGowan DA. Quantitative bacteriology of acute dento-alveolar abscesses. *J Med Microbiol* 1986 Mar 1;21(2):101-4.
- (45) Lima KC, Fava LRG, Siqueira J. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* Biofilms to Some Antimicrobial Medications. *Journal of Endodontics* 2001 Oct;27(10):616-9.
- (46) Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer Verlag, Berlin , 46-52. 2001.
- (47) Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal* 2001;34(5):399-405.
- (48) Love RM. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococcus gordonii*. *Journal of Endodontics* 1996 Jun;22(6):290-3.
- (49) Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, Pherson III JC. In Vitro Antimicrobial Activity of Various Medication Preparations on *E. faecalis* in Root Canal Dentin. *Journal of Endodontics* 2003 Mar;29(3):187-90.
- (50) Marley JT, Ferguson DB, Hartwell GR. Effects of Chlorhexidine Gluconate as an Endodontic Irrigant on the Apical Seal: Short-Term Results. *Journal of Endodontics* 2001 Dec;27(12):775-8.
- (51) McCrary BR, Streckfuss JL, Keene HJ. Oral hygiene and the prevalence of oral group D streptococci in medically-physically compromised and periodontal disease patients. *J Periodontol* 1989 May;60(5):255-8.

- (52) Molander A, Reit C, Dahlen G. Microbiological evaluation of clindamycin as a root canal dressing in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1990 Mar;23(2):113-8.
- (53) Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998 Jan;31(1):1-7.
- (54) Morris MD, Lee KW, Agee KA, Bouillaguet S, Pashley DH. Effects of Sodium Hypochlorite and RC-Prep on Bond Strengths of Resin Cement to Endodontic Surfaces. *Journal of Endodontics* 2001 Dec;27(12):753-7.
- (55) Morrison D, Woodford N, Cookson B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology* 1997;83(s1):89S-99S.
- (56) Murray BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev* 1990 Jan 1;3(1):46-65.
- (57) Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2005 Feb;99(2):231-52.
- (58) Nandakumar R, Mirchandani R, Fouad A. Primer sensitivity: can it influence the results in Enterococcus faecalis prevalence studies? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2007 Mar;103(3):429-32.
- (59) Neuwelt EA, Brummett RE, Remsen LG, Kroll RA, Pagel MA, McCormick CI, et al. In Vitro and Animal Studies of Sodium Thiosulfate as a Potential Chemoprotectant against Carboplatin-induced Ototoxicity. *Cancer Res* 1996 Feb 15;56(4):706-9.
- (60) Newberry BM, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. The Antimicrobial Effect of Biopure MTAD on Eight Strains of Enterococcus faecalis: An In Vitro Investigation. *Journal of Endodontics* 2007 Nov;33(11):1352-4.
- (61) Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Dental Traumatology* 1990;6(4):142-9.
- (62) Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of Enterococcus faecalis in Previously Root-Filled Canals in a Lithuanian Population. *Journal of Endodontics* 2000 Oct;26(10):593-5.
- (63) Perdigao J, Lopes M, Geraldeli S, Lopes GC, Garcia-Godoy F. Effect of a sodium hypochlorite gel on dentin bonding. *Dental Materials* 2000 Sep;16(5):311-23.
- (64) Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal* 2003 Jan 1;36(1):1-11.

- (65) Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 2004;37(7):438-46.
- (66) Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1992 Aug;7(4):249-52.
- (67) Reit C. Decision strategies in endodontics: on the design of a recall program. *Endod Dent Traumatol* 1987 Oct;3(5):233-9.
- (68) Rocas IN, Siqueira J, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. *Journal of Endodontics* 2004 May;30(5):315-20.
- (69) Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2004 Oct;98(4):488-92.
- (70) Rossi-Fedele G, Roberts AP. A preliminary study investigating the survival of tetracycline resistant *Enterococcus faecalis* after root canal irrigation with high concentrations of tetracycline. *International Endodontic Journal* 2007 Oct 27;40(10):772-7.
- (71) Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Orstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *International Endodontic Journal* 2004;37(3):193-8.
- (72) Sassone LM, Fidel RAS, Fidel SR, Dias M, Hirata Junior R. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Brazilian Dental Journal* 2003;14:99-102.
- (73) Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Two Calcium Hydroxide Formulations Against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 2005 Jan;31(1):53-6.
- (74) Schilke R, Lisson JA, Bau[ss] O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Archives of Oral Biology* 2000 May;45(5):355-61.
- (75) Schirrmeister JrF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and Eradication of Microorganisms in Root-filled Teeth Associated With Periradicular Lesions: An In Vivo Study. *Journal of Endodontics* 2007 May;33(5):536-40.
- (76) Schmalz G, Thonemann B. Die Amalgamfüllung. In Heidemann D (Hrsg): *Kariologie und Füllungstherapie. Praxis der Zahnheilkunde, Band 2.* Urban&Schwarzenberg Verlag, München, 299 (1999).

- (77) Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability Characteristics of Bovine and Human Dentin under Different Pretreatment Conditions. *Journal of Endodontics* 2001 Jan;27(1):23-30.
- (78) Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiology and Immunology* 2005;20(1):10-9.
- (79) Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Dental Traumatology* 1995 Feb 3;11(1):6-9.
- (80) Sena NT, Gomes BPFA, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *International Endodontic Journal* 2006;39(11):878-85.
- (81) Shabahang S, Pouresmail M, Torabinejad M. In Vitro Antimicrobial Efficacy of MTAD and Sodium Hypochlorite. *Journal of Endodontics* 2003 Jul;29(7):450-2.
- (82) Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-Contaminated Root Canals of Extracted Human Teeth. *Journal of Endodontics* 2003 Sep;29(9):576-9.
- (83) Shih M, Marshall FJ, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1970 Apr;29(4):613-9.
- (84) Silva Garcez A, Nunez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006 Oct;102(4):e93-e98.
- (85) Sim TPC, Knowles J, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *International Endodontic Journal* 2001;34(2):120-32.
- (86) Siqueira J. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *International Endodontic Journal* 2001;34(1):1-10.
- (87) Siqueira J, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics* 1996 Dec;22(12):674-6.
- (88) Siqueira J, de Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics* 1996 Jun;22(6):308-10.
- (89) Siqueira J, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical Reduction of the Bacterial Population in the Root Canal after Instrumentation and Irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% Sodium Hypochlorite. *Journal of Endodontics* 2000 Jun;26(6):331-4.

- (90) Siren EK, Haapasalo M, Ranta KT, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal* 1997;30(2):91-5.
- (91) Siren EK, Haapasalo M, Waltimo TMT, Orstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *European Journal of Oral Sciences* 2004;112(4):326-31.
- (92) Smyth CJ, Halpenny MK, Ballagh SJ. Carriage rates of enterococci in the dental plaque of haemodialysis patients in Dublin. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1987 Feb;25(1):21-33.
- (93) Sobrinho APR, Barros MHM, Nicoli JR, Carvalho MAR, Farias LM, Bambirra EA, et al. Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *Journal of Endodontics* 1998 Jun;24(6):405-8.
- (94) Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials : 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1973 Dec;36(6):856-71.
- (95) Spano JC, Barbin EL, Santos TC, Guimaraes LF, Pecora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. *Braz Dent J* 2001;12(3):154-7.
- (96) Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *Journal of Endodontics* 2006 Feb;32(2):93-8.
- (97) Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1998 Jan;85(1):86-93.
- (98) Sylvester DM, Hayton WL, Morgan RL, Way JL. Effects of thiosulfate on cyanide pharmacokinetics in dogs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1983 Jun 30;69(2):265-71.
- (99) Tang HM, Nordbo H, Bakland LK. Pulpal response to prolonged dentinal exposure to sodium hypochlorite. *International Endodontic Journal* 2000;33(6):505-8.
- (100) Tonami K, Araki K, Matakai S, Kurosaki N. Effects of chloramines and sodium hypochlorite on carious dentin. *J Med Dent Sci* 2003 Jun;50(2):139-46.
- (101) Turkun M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *International Endodontic Journal* 1997;30(5):335-42.
- (102) Vergis EN, Hayden MK, Chow JW, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, et al. Determinants of Vancomycin Resistance and Mortality Rates in

Enterococcal Bacteremia: A Prospective Multicenter Study. *Ann Intern Med* 2001 Oct 2;135(7):484-92.

- (103) Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 2004 Jan;97(1):79-84.
- (104) Waltimo TMT, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo M. In Vitro Yeast Infection of Human Dentin. *Journal of Endodontics* 2000 Apr;26(4):207-9.
- (105) Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, ener-West M, Johnson JD. The Effect of Passive Ultrasonic Activation of 2% Chlorhexidine or 5.25% Sodium Hypochlorite Irrigant on Residual Antimicrobial Activity in Root Canals. *Journal of Endodontics* 2003 Sep;29(9):562-4.
- (106) White JD, Lacefield WR, Chavers LS, Eleazer PD. The Effect of Three Commonly Used Endodontic Materials on the Strength and Hardness of Root Dentin. *Journal of Endodontics* 2002 Dec;28(12):828-30.
- (107) Wuerch RMW, Apicella MJ, Mines P, Yancich PJ, Pashley DH. Effect of 2% Chlorhexidine Gel as an Intracanal Medication on the Apical Seal of the Root-Canal System. *Journal of Endodontics* 2004 Nov;30(11):788-91.
- (108) Yang SF, Rivera EM, Baumgardner KR, Walton RE, Stanford C. Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 1995 Dec;21(12):613-6.
- (109) Zamany A, Safavi K, Spangberg L. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 2003 Nov;96(5):578-81.

10. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
a	Sterilkontrolle
b	Infektionskontrolle
B. subtilis	Bacillus subtilis
BHI	Brain Heart Infusion
c	Desinfektionskontrolle
C. albicans	Candida albicans
Ca(OH)₂	Calciumhydroxid
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxide
E. faecium	Enterococcus faecium
E. faecalis	Enterococcus faecalis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	molar
MBC	minimal bactericidal concentration
MIC	minimal inhibitory concentration
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
MTAD	MT für Initiale des Entwicklers, T Tetracyclin; A acid, D Detergens
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa

P. micros	Peptostreptococcus micros
P. prevotii	Peptostreptococcus prevotii
PDT	photodynamische Therapie
PVP-Iod	Povidon-Jod
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. constellatus	Streptococcus constellatus
sec	Sekunde
u.a.	unter anderem
ve	voll entsalzen

11. Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. G. Schmalz für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Mein weiterer ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. K.-A. Hiller. Er hat durch seine außerordentlich gute und fürsorgliche Betreuung, durch die Erstellung der Statistik und der Lektüre der Entwürfe, maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen.

Frau Claudia Waha danke ich für die gute Einweisung in die Labortechniken, die tatkräftige Hilfe bei plötzlich aufgetretenen Problemen und die organisatorische Unterstützung bei der Beschaffung der Materialien.

Vielen Dank an Frau Helga Ebensberger, die mit mir die rasterelektronenmikroskopischen Bilder erstellte.

Ein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Forschungslabors der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, die mich in ihren Räumen aufnahmen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für die stetige und verständnisvolle Unterstützung in den vergangenen Studienjahren.

12. Lebenslauf

Geburtsdatum:	20.Juni 1981
Geburtsort:	Burghausen
September 1987:	Besuch der Grundschule in Dorfen
September 1991:	Übertritt in das Gymnasium Dorfen
Juli 2000:	Erlangen der allgemeinen Hochschulreife
Oktober 2000:	Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität in München zum Studium der Zahnmedizin
September 2001:	Naturwissenschaftliche Vorprüfung an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Oktober 2001:	Universitätswechsel von der Ludwig-Maximilians-Universität an die Universität Regensburg
Oktober 2003:	Zahnärztliche Vorprüfung an der Universität Regensburg
Juli bis November 2006:	Zahnärztliche Prüfung an der Universität Regensburg
Februar 2007	Erhalt der Approbation
Seit September 2007:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Klinikum der Universität Regensburg, Lehrstuhl Prof. Dr. G. Schmalz